81

THESES

présentées à la

Faculté des Sciences de l'Université de Toulouse

pour obtenir le titre de

Docteur - Ingénieur

par

Daniel BONIN

PREMIERE THESE :

CONTRIBUTIONS
A L'ETUDE DE LA CONSERVATION DES VINS DOUX

SECONDE THESE :

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

soutenues le 18 Octobre 1963 devant la Commission d'Examen

Président : M. DIEHL

Examinateurs : MM. MARGULIS

RIVALS

THESES

présentées à la

Faculté des Sciences de l'Université de Toulouse

pour obtenir le titre de

Docteur - Ingénieur

par

Daniel BONIN

PREMIERE THESE :

CONTRIBUTIONS
A L'ETUDE DE LA CONSERVATION DES VINS DOUX

SECONDE THESE :

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

soutenues le 18 Octobre 1963 devant la Commission d'Examen

Président : M. DIEHL

Examinateurs : MM. MARGULIS

RIVALS

CHAMPIGNY-SUR-MARNE (Seine)

Imprimerie SAULAIS

6, Rue Dupertuis

—

1963

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

INTRODUCTION

Les vins liquoreux ou doux sont des vins ayant conservé une quantité suffisante de sucre qui leur communique un goût sucré plus ou moins prononcé. Leur vinification ne comporte rien de particulier et ne s'écarte guère d'une vinification courante. Mais la nature même du produit obtenu pose des problèmes spéciaux et, en premier lieu, celui de sa conservation. En effet, le sucre résiduel est à tout moment susceptible d'entrer en fermentation, d'où trouble et dégagement gazeux qui modifient l'aspect et les qualités organoleptiques du vin. Il n'en résulte pas obligatoirement une diminution de la valeur intrinsèque mais une perte de valeur commerciale : le consommateur ne reconnaît pas son vin, il le refuse lorsqu'il présente un trouble ou un dépôt accompagné ou non d'un pétillement. La possibilité de refermentation de son produit constitue le souci essentiel pour le producteur de vin doux ou liquoreux. On dirait plus vulgairement que c'est son "cauchemar" contre lequel, il faut bien le dire, il se défend souvent assez difficilement. A cela, d'ailleurs, il y a plusieurs raisons : la première est la méconnaissance fréquente du fond du problème et des remèdes possibles ; la seconde est l'absence de solution à la fois parfaite et facile au problème de la conservation des vins doux et liquoreux.

Quels sont les moyens de lutte contre les refermentations qui sont proposés ?

On parle — bien entendu sous le manteau — de toutes sortes d'antibiotiques, d'antiferments, d'antiseptiques nouveaux. Disons tout de suite que l'usage de tous ces produits est interdit par la loi et, qu'en plus, cet usage rebute le vinificateur. Il est évident que l'on ne peut qu'approuver et le législateur et le vinificateur. L'emploi d'un produit dans le domaine alimentaire ne peut être admis que lorsque son innocuité absolue sur le consommateur et sur sa descendance a été démontrée d'une façon rigoureuse. Or, aucun des produits proposés ne présente une innocuité absolue certaine pour le consommateur et sa postérité. Ils doivent donc rester pendant longtemps dans le domaine expérimental des laboratoires de recherches.

On a proposé assez récemment un procédé déjà ancien qui est celui de la pasteurisation. Certaines caves productrices de vins doux (y compris celle qui nous occupera tout spécialement dans ce travail) emploient ce procédé couramment. Il est indéniable que, pratiqué sur du vin en bouteilles, le procédé atteint parfaitement le but qu'il se propose : éviter la refermentation du vin embouteillé. Lorsque le vin est "pasteurisé" en vrac, la température atteinte par le liquide étalé en couche relativement mince varie entre 52° et 58°. Elle est suffisante pour tuer les levures à l'état végétatif. Quant aux levures sporulées, après le traitement elles ne sont, en général, pas assez nombreuses pour réussir une remise en fermentation du vin.

Mais si l'effet de la pasteurisation sur les levures est indéniable, son effet sur le vin ne l'est pas moins. La connaissance de ces effets ne date pas d'aujourd'hui : le maintien du vin pendant un certain temps en couche mince et à température relativement élevée ne va pas sans oxydation de ses constituants, sans départ de produits volatils, sans début de caramélisation. Il en résulte une perte de bouquet et une apparition de goût de cuit, parfois assez prononcées. Le moins que l'on puisse dire est que le procédé est délicat et ne peut être mis qu'entre les mains d'un spécialiste. Son application peut, à la rigueur, présenter un intérêt pour les vins moyens, mais il est à déconseiller pour le traitement des vins de grande qualité. On notera, enfin, que le procédé ne s'applique qu'au vin en bouteilles et qu'il est pratiquement inutilisable pour la conservation du vin en barrique et en cuve.

Reste, enfin, le procédé de lutte le plus ancien : celui de l'emploi du gaz sulfureux. Il mérite le qualificatif d'universel. C'est, en effet, le procédé le plus répandu et il intervient, à titre complémentaire, dans tous les procédés, y compris celui de la pasteurisation.

Le gaz sulfureux est employé depuis des temps immémoriaux pour aseptiser la vaisselle vinaire et, aussi, le vin. Il ne pose, pour ainsi dire, pas de difficulté lorsqu'il s'agit de vins secs. Dans ce cas son rôle d'antiseptique s'exerce essentiellement contre les bactéries, bien moins résistantes à SO_2 que les levures. Les quantités à employer restent faibles.

Il n'en est plus de même lorsque le vin traité est un vin doux. Les quantités à employer s'accroissent rapidement avec les teneurs en sucre du vin et deviennent rapidement considérables. En effet, le sucre "fixe" le gaz sulfureux, et le gaz sulfureux ainsi fixé perd ses vertus antiseptiques. En fait un équilibre s'établit entre SO_2 fixé et SO_2 resté libre, mais pour que la proportion de SO_2 actif soit sensible, il faut en employer des doses importantes.

Une partie de SO_2 non fixé par le sucre (ou autres composés à fonction aldéhydique et cétonique) est salifiée et se retrouve, en fait, à l'état de bisulfite de potassium ; une autre reste à l'état gazeux. Le rapport entre ces deux fractions, dépend avant tout de l'acidité réelle du vin. Plus un vin est acide et plus la proportion de SO_2 gazeux est grande. Or les vins doux sont, en général, peu acides. Leurs raisins sont récoltés à l'état de maturité avancée, souvent à l'état de surmaturité exacerbée, en quelque sorte, par la pourriture dite noble.

Si on ne peut dénier à $HKSO_3$ des qualités d'antiseptique, il est certain que celles de SO_2 le font découvrir dans certains vins auxquels elles communiquent une odeur désagréable. On voit d'ici le dilemme pour ainsi dire "épique" devant lequel se trouve le producteur de vin doux : pour être certain d'éviter tout accident de refermentation, il sait que le vin doit contenir une quantité suffisante de SO_2 pour qu'une partie reste à l'état gazeux, mais il sait aussi que son vin peut présenter l'odeur et le goût, plus ou moins prononcés, de ce gaz. Il faut avouer qu'il choisit, en général, l'alternative de l'excès de SO_2.

Il n'est pas dans nos intentions de discuter l'effet sanitaire d'un excès de SO_2. Cette discussion est à l'heure actuelle très en vogue, mais on ne peut dire qu'elle se passe toujours dans des limites raisonnables. La nocivité d'une consommation abusive de SO_2 n'a point besoin de démonstration. Mais il serait sûrement exagéré de prétendre qu'une consommation même légère de cette substance est nocive. Depuis que l'humanité méditerranéenne en consomme régulièrement, les effets en seraient apparents. Nul doute que parmi les tenants d'une telle opinion il y a beaucoup de partisans des produits nouveaux dont nous avons parlé plus haut.

Il n'en reste pas moins vrai qu'un excès de SO_2 dans un vin a pour effet immédiat une baisse de qualité du produit qui, obligatoirement, entraîne une baisse de sa valeur commerciale. Sur le marché intérieur, au moins, la consommation des vins de qualité a subi une augmentation dont les vins doux n'ont pas profité. Quant à la consommation extérieure, il semble bien que la demande de ces vins serait bien plus grande, leur diffusion bien plus facile, en l'absence de "l'écueil sulfureux".

Il ne faudrait pas en conclure trop hâtivement que le procédé idéal de conservation ne devrait pas comporter l'usage de gaz sulfureux. Il n'en est rien. Ce qui est nuisible, c'est l'excès de ce produit. Une quantité ménagée de gaz sulfureux est bénéfique à la qualité de tous les vins, y compris les vins doux et liquoreux. On peut même dire que sa présence conditionne la qualité. Il semble bien, en effet, que la présence d'un minimum de 200 mg/l de SO_2 environ est indispensable pour qu'un vin doux puisse acquérir et conserver toutes ses qualités.

Mais tel qu'il est pratiqué, l'emploi de SO_2 présente de graves inconvénients, difficiles sinon impossibles à éviter, et il est normal que d'autres procédés soient recherchés pour le remplacer, au moins en partie.

Quoiqu'il en soit, la recherche d'un procédé évitant la refermentation des vins doux, autre que ceux qui ont été cités (pasteurisation, antiseptiques) garde toute son utilité. Ce travail relate une tentative faite dans ce sens. Elle consiste essentiellement en la sélection d'une ou plusieurs levures, incapables de résister à une concentration en alcool supérieure à celle du vin étudié. En ensemençant un moût, avant le départ de la fermentation, d'une dose massive de la levure sélectionnée, on peut espérer que celle-ci dominera dès le début les levures, en général peu nombreuses, apportées par la vendange, et qu'elle empêchera leur multiplication dans le milieu en fermentation. L'apport d'un pied de cuve massif de levure sélectionnée n'élimine pas les levures apportées par la vendange dont certaines peuvent pousser les fermentations au-delà du degré alcoolique désiré. Ces levures persistent dans le milieu sans se multiplier. Elles ne dépassent pas ce qu'en microbiologie on appelle le stade d'adaptation. Il semble d'ailleurs que pour dépasser ce stade et pour entrer dans le stade suivant de la multiplication active et rapide, la levure susceptible d'atteindre un haut degré alcoolique est favorisée, sinon conditionnée, par la fermentation préa-

lable des levures faiblement alcoogènes. De sorte que dans un moût entré spontanément en fermentation on constate une sorte de succession : les premières levures à se développer sont les levures faiblement alcoogènes, souvent classées parmi les sauvages ou apiculées, ne supportant pas une concentration en alcool supérieure à 5° ; ensuite les levures moyennement alcoogènes, classées autrefois parmi les levures rondes et ne dépassant pas 8-9° et enfin, la fermentation se termine par une multiplication des levures fortement alcoogènes dont certaines peuvent atteindre 14° et au-delà. Entre les levures de faible et de fort pouvoir alcoogène les différences sont souvent d'ordre spécifique. Mais fréquemment une même espèce de levures fournit des individus à résistance variable à l'alcool : les uns peu résistants, les autres très résistants. On s'en rendra abondamment compte dans les pages qui vont suivre.

L'idée qui a présidé à ce travail est donc assez claire. Mais il est évident que son application n'est pas simple. Les difficultés qui se présentent sont de deux ordres différents. D'une part, la résistance d'une levure à l'alcool ne dépend pas de la seule concentration du milieu en cet élément, mais de l'ensemble des conditions et, en premier lieu, de sa teneur en substances azotées. D'autre part, l'apport d'une levure sélectionnée entraîne obligatoirement une modification de la technique de la vinification, difficile à réaliser dans une cave dont le mode de travail est toujours plus ou moins routinier.

Mais, comme on le verra plus loin, ces difficultés ne sont pas insurmontables et le procédé proposé semble pouvoir tenir toutes ses promesses.

*
**

Cet essai a été réalisé pour les vins blancs doux de Monbazillac. Il s'agissait de produire deux types de vins de la Cave coopérative de ce cru : l'un devant titrer 11°5 d'alcool et conserver 35 g/l de sucre, l'autre 13° d'alcool et 55g/l de sucre environ.

Notre travail a été prévu en deux phases :

Dans un premier temps nous isolerons des clones de levures. Comme les populations levuriennes sont caractéristiques de chaque cru, ces souches seront isolées dans un moût en fermentation provenant de Monbazillac. Ensuite les caractères et les produits de fermentation de chaque souche ensemencée dans un même moût de Monbazillac permettront de sélectionner les meilleures clones. Accessoirement nous étudierons la taxonomie des souches les plus intéressantes.

Dans une seconde phase nous essaierons de vinifier des moûts de Monbazillac avec les levures sélectionnées et de trouver une technique de vinification, simple.

Dans le premier chapitre de ce mémoire ont été groupés les milieux de culture et les techniques analytiques utilisés au cours de notre travail.

*
**

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Technologie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse. Nous exprimons notre très vive gratitude et notre respectueux attachement à M. le Professeur MARGULIS qui a dirigé cette thèse. Nous lui devons notre formation. Son appui matériel et moral a été pour nous le meilleur des encouragements.

Nos remerciements vont également à M. le Professeur DIEHL, Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, qui nous a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse, ainsi qu'à M. le Professeur RIVALS qui a bien voulu juger ce travail.

Nous tenons enfin à remercier nos collègues et amis du Laboratoire de Technologie Agricole où nous avons pu travailler dans une atmosphère de franche camaraderie.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547605_0104

CHAPITRE PREMIER

MILIEUX DE CULTURE - TECHNIQUES ANALYTIQUES

MILIEUX DE CULTURE

A. Milieux liquides.

1. *Moût de bière.*

Le produit de la mouture de 200 g de malt, délayé dans un litre d'eau est mis au bain-marie dont la température est lentement élevée en une demi-heure, puis maintenue à 60° pendant trois quarts d'heure en agitant fréquemment. Après addition de 4 g de houblon, le mélange est maintenu à l'ébullition pendant une heure. Le liquide refroidi est exprimé à l'aide d'un tissu fin et stérilisé à l'autoclave (10 minutes à 120° C). Une filtration sur papier rend le milieu parfaitement limpide. Le filtrat, amené par addition d'eau à la densité 1,059, reçoit quelques gouttes d'eau de levure par litre et subit une seconde stérilisation (10 minutes à 115° C).

2. *Eau de levure.*

100 g de levure fraîche sont délayés dans un litre d'eau qui est soumis pendant cinq minutes à l'ébullition et filtré à chaud sur papier. Le filtrat est stérilisé à l'autoclave (15 minutes à 115° C).

3. *Moût de raisin stérile.*

Le jus de raisin est transporté de la cave au laboratoire dans des bonbonnes en verre, dans lesquelles il est conservé pendant quatre jours à + 3° C. Le moût décanté est transvasé, dans des ballons de trois litres. Il est stérilisé à l'autoclave (15 minutes à 115° C). Avant emploi, le moût subit une filtration sur papier, nécessaire à l'élimination du trouble provoqué par le chauffage, et une seconde stérilisation (10 minutes à 110° C).

4. *Milieu synthétique minéral.*

Il comprend par litre :

$KH_2 PO_4$	2 g
$Mg SO_4, 7 H_2O$	1 g
$(NH_4)_2 SO_4$	2 g
Glucose	50 g
Eau de levure	qq gouttes
Eau distillée q.s.p. ...	1000

Le liquide, généralement réparti dans des tubes à essai à raison de 10 ml, est stérilisé à l'autoclave (10 minutes à 110° C).

5. *Extrait de malt.*

1 kg de mouture de malt est délayé dans 2,6 litres d'eau et chauffé 3 heures au bain-marie à 45° C en remuant fréquemment. La température est ensuite élevée jusqu'à 65° C et maintenue une heure. Le jus est alors exprimé à l'aide d'un tissu fin, et stérilisé 15 minutes à 120° C. On le filtre. La densité du milieu est ajustée à 1,059 et le pH à 5,4 au pH-mètre. L'extrait est réparti à raison de 30 ml dans les erlenmeyers de 100 ml et stérilisé à l'autoclave (15 minutes à 110° C).

B. **Milieu solide.**

Moût de bière gélosé.

Le filtrat du moût de bière, obtenu comme il est indiqué ci-dessus, est dilué jusqu'à atteindre la densité de 1,040 et neutralisé à l'aide d'une solution N/10 de NaOH. Le liquide additionné de 18 g par litre de gélose est stérilisé à l'autoclave (15 minutes de 120° C).

TECHNIQUES ANALYTIQUES

1. *Alcool* (12)*

Le volume de vin disponible pour l'analyse étant généralement faible, la plupart des dosages furent effectués sur le distillat de 10 ml de vin, par oxydation de l'alcool à froid à l'aide de bichromate de potassium en présence d'acide sulfurique concentré.

Dans le cas des vins contenant moins de 10 g par litre de sucres réducteurs, le dosage de l'alcool avait lieu par ébullioscopie.

2. *Acidité totale* (5)

Acidimétrie avec une solution N/10 de NaOH, une solution de rouge de phénol à 0,2 ‰ dans l'eau servant d'indicateur externe.

3. *Acidité volatile* (4)

Le distillat recueilli au sortir de l'appareil de Ferré et Archinard est neutralisé par une solution N/10 de NaOH en présence de phtaléine du phénol à 1 % dans l'alcool à 95°. Le résultat est corrigé par soustraction de l'acidité due à SO_2 titrable par une solution d'iode N/100.

4. *Anhydride sulfureux libre et total* (11)

Méthode d'essai rapide de Ripper.

* Les chiffres entre parenthèses renvoient à la liste des auteurs, page 67.

5. *Sucres réducteurs* (6)

Les sucres réducteurs sont dosés suivant la méthode officielle française de 1907 après défécation du moût ou du vin au ferrocyanure de zinc.

6. *Azote.*

a) *Azote total* (7). — D'après KJELDAHL. Le catalyseur de minéralisation employé est le sélénium à 2 ‰ dans H_2SO_4 concentré. Il serait utile d'essayer un autre catalyseur car ces minéralisations sont très longues. Le sulfate de cuivre, à raison de 1 g pour 20 ml de vin, semble être aussi efficace que le sélénium et empêcher une formation de mousse aussi abondante.

b) *Azote ammoniacal* (6,1). — Avant de subir la distillation, le milieu est neutralisé avec $CaCO_3$ qui l'amène à pH 6-7, puis avec MgO fraîchement calciné qui l'amène à pH 8.

c) *Azote aminé* (6). — Il est titré, directement sur le vin ou le moût, au formol en présence de rouge de phénol utilisé comme indicateur externe.

7. *Phosphates.*

a) *Phosphates totaux* (2). — Dans un matras contenant 5 ml de moût on ajoute 10 ml H_2SO_4 et 2 ml d'une solution de sélénium à 2 ‰ dans H_2SO_4 concentré. On minéralise en chauffant. On amène à pH2 environ avec de la soude en pastilles, et on dilue au 1/10. Sur une partie aliquote on cherche à l'aide d'une solution N de NaOH la quantité utile de soude pour ajuster le pH à 5 et on dilue au 1/50. Sur cette dernière solution on dose les phosphates à l'aide du réactif molybdique.

b) *Phosphates minéraux.* — Le dosage est effectué directement sur le vin, en utilisant le bloc de Walpole pour éliminer l'influence de la couleur du vin.

CHAPITRE II

ISOLEMENT DES SOUCHES

SOURCE DES LEVURES ISOLEES

Les levures furent isolées dans un moût prélevé pendant les vendanges 1961 dans une cuve de la Cave Coopérative de Monbazillac. Ce moût répondait aux conditions de production des vins à appellation d'origine contrôlée "Monbazillac" qui correspondent aux critères suivants :

— Le *lieu de production :* Communes de Monbazillac, Rouffignac de Sigoulès ; Colombier, Pomport, et une partie de Saint-Laurent des Vignes ;

— Les *cépages :* Sémillon, Sauvignon, Muscadelle ;

— La *richesse en sucre naturel du moût :* 221 g/l au minimum dont 11° d'alcool acquis ;

— Le *rendement à l'hectare :* 40 hl au maximum ;

— La *taille :* Guyot simple ou double ;

— La *récolte :* par triées successives après la surmaturation due au *Botrytis cinerea*, responsable de la pourriture noble du raisin.

Au moment du prélèvement le moût était en pleine fermentation et titrait 6° d'alcool. Le transport de la Cave au laboratoire eut lieu dans un récipient stérile bouché par un tampon de coton. On a laissé la fermentation se poursuivre en la ralentissant de temps en temps par maintien au réfrigérateur à +5° C environ. Elle a pu ainsi s'étaler sur plusieurs jours. Entre temps des prélèvements ont été faits correspondants aux différents stades de la fermentation, jusqu'à l'épuisement complet du sucre. A ce moment le moût primitif était transformé en vin titrant 13°2.

Isolement des levures.

La technique utilisée est celle décrite par CASES (1). Nous n'y reviendrons que très brièvement. Comparée à la méthode classique de dilutions et d'ensemencements sur moût de raisin gélatiné, elle offre l'avantage d'être plus rapide et surtout de garantir la pureté des clones isolés.

Sans remettre en suspension le dépôt de levures du récipient, une fraction du moût surnageant et trouble est prélevée aseptiquement avec une pipette Pasteur et placée dans un tube à essai stérile. On prélève

en même temps 10 ml de moût pour déterminer le degré alcoolique atteint.

La concentration en cellules du liquide prélevé doit être telle qu'une goutte, déposée sur la lamelle d'une chambre humide de Böttcher et de la taille de 2 à 3 champs du microscope, ne contienne qu'une seule cellule. Pour ce faire, on soumet un certain nombre de gouttes à un examen microscopique préalable. On dilue ensuite une partie du moût dans du moût de bière, d'un nombre de fois égal à la moyenne des cellules comptées dans les gouttes.

La lamelle de chaque chambre humide reçoit 16 gouttes déposées à l'aide d'un tire-ligne stérile. Les gouttes sont observées une à une et on repère celles qui ne contiennent qu'une cellule.

Les chambres sont conservées dans une boîte isotherme pendant 18 heures au bout desquelles les gouttes repérées sont examinées à nouveau. Cet examen est nécessaire pour connaître les cellules capables de bourgeonner.

Chaque goutte, où l'on observe la multiplication de la levure et la formation d'un seul amas de cellules, est absorbée par un petit triangle de papier-filtre qui est ensuite introduit aseptiquement dans un tube à essai contenant 10 ml de moût de raisin stérile. Les chambres sont marquées par deux lettres et, dans une chambre, les gouttes sont numérotées de 1 à 16. Chaque souche isolée dans un tube porte donc le numéro de la goutte dans laquelle la cellule mère, qui lui a donné naissance, a été isolée. On a ainsi la certitude que chaque souche est issue d'une seule cellule par multiplication végétative et constitue ce qu'en génétique on appelle un clone.

Les tubes sont examinés toutes les huit heures jusqu'à départ de la fermentation, ensuite tous les jours. Pour chaque souche, on note le temps de latence compris entre le moment de l'ensemencement et celui du début de la fermentation ; et la durée de la fermentation, c'est-à-dire la période qui va de l'apparition des bulles au dépôt des levures dans le tube.

Les clones âgés d'un mois qui n'ont pas montré de dégagement gazeux sont éliminés. Les autres sont ensemencés sur moût de bière gélosé pour être conservés. C'est de cette culture sur milieu solide que l'on prélèvera les levures destinées à la préparation du levain utile aux essais de fermentation, dont la description fait partie du chapitre suivant.

RESULTATS

Comme le montre le tableau I, 1.093 cellules furent isolées par la technique décrite, 439 d'entre elles avaient formé un petit massif de cellules après dix-huit heures de maintien dans la boîte isotherme, et ont été repiquées dans 439 tubes à essai contenant du moût de raisin stérile. Dans 290 tubes seulement les levures se sont multipliées et ont fait fermenter le milieu.

TABLEAU I

Résultats de l'isolement des souches

Degré d'isolement	Nombre de cellules isolées dans une goutte	Nombre de cellules isolées ayant bourgeonné dans une goutte	Nombre de clones développés dans un tube
6°	45	10	0
6°4	178	72	15
6°7	90	36	25
8°1	72	31	20
9°4	149	61	42
10°2	46	32	25
10°9	57	35	20
11°2	153	76	71
11°6	65	23	15
12°3	147	52	49
13°2	81	11	8
TOTAL..	1.093	439	290

Le fait que la cellule-mère bourgeonne plus ou moins dans la goutte de milieu nutritif est l'indice de sa vitalité. Certaines cellules-mères, très actives, forment un amas volumineux de cellules. D'autres ne donnent qu'un groupe de 7 à 8 bourgeons ou même de 2 à 3 seulement. Enfin certaines ne bourgeonnent pas.

Appliquant la même technique, CASES ensemençait les tubes de moût de raison stérile avec les levures isolées, sans tenir compte de la vitalité des cellules-mères. Le pourcentage de tubes où se sont multipliées les levures par rapport aux tubes ensemencés s'élevait à 40 %. Le même auteur indique qu'en repiquant sur moût stérile uniquement

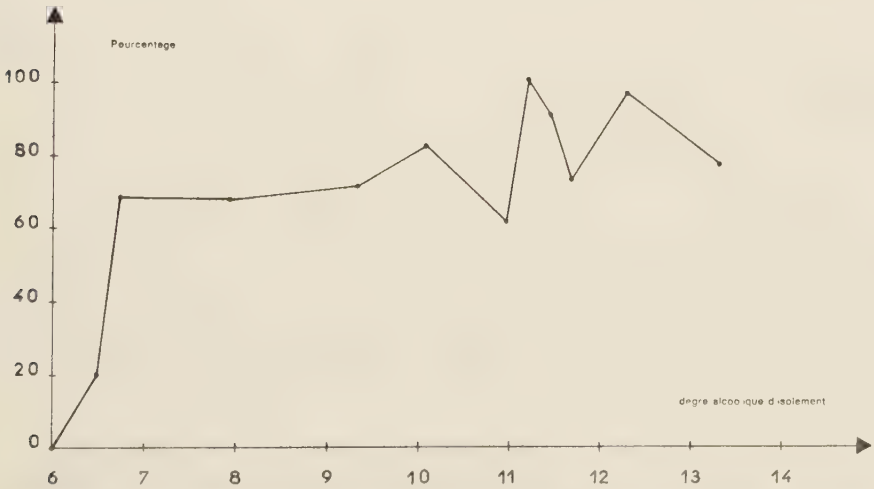


FIG. 1. — *Pourcentage des levures ayant provoqué une fermentation dans les tubes par rapport aux levures ayant bourgeonné dans les gouttes sur lamelle, en fonction du degré alcoolique d'isolement.*

les cellules multipliées dans les gouttes on peut s'attendre à une amélioration du rendement, tout en étant assuré d'avoir une représentation fidèle de la population. Tenant compte de cette remarque, seules les cellules qui ont formé une petite colonie (de 7 à 8 bourgeons au moins) dans la goutte de milieu nutritif ont été ensemencées dans des tubes et conservées. Le rendement obtenu a été de 66 % (290 souches sur 439).

Le pourcentage des levures ayant provoqué une fermentation dans les tubes par rapport aux cellules qui ont bourgeonné dans les gouttes sur lamelle, augmente avec le degré d'isolement (fig. 1). Au départ, parmi les levures actives qui se sont multipliées dans la goutte de moût de bière, peu sont capables de se développer dans le moût de raisin stérile. Lorsque le milieu atteint un degré alcoolique plus élevé, presque toutes les levures actives isolées sont capables de se multiplier dans le moût de raisin stérile et de provoquer une fermentation. On peut donc dire qu'il y a adaptation de la population aux variations du milieu par élimination de certains individus quand le degré alcoolique augmente.

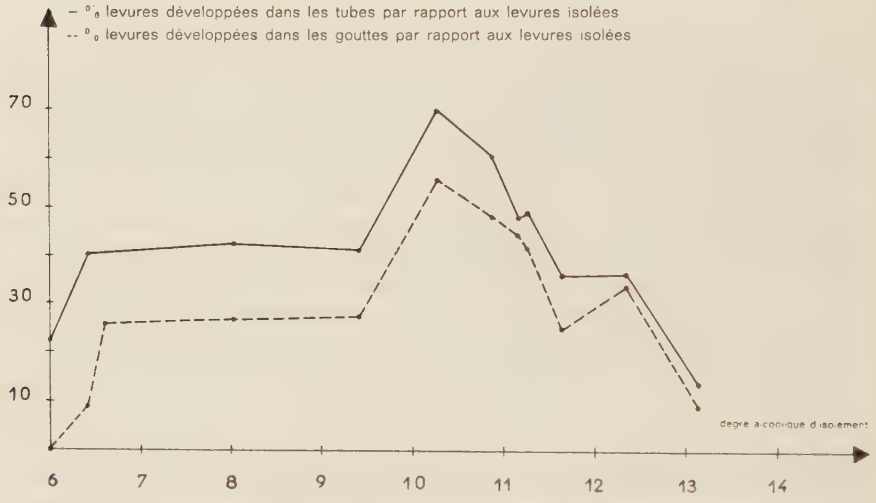


FIG. 2. — *Pourcentage des levures développées dans les gouttes ou dans les tubes par rapport aux levures isolées, en fonction du degré d'isolement.*

La figure 2 montre que le pourcentage des levures ayant fait fermenter le moût dans les tubes par rapport à l'ensemble des levures isolées, et le pourcentage des levures qui ont bourgeonné dans les gouttes par rapport à l'ensemble des levures isolées, passent par un maximum quand le degré alcoolique du milieu varie. Le maximum d'activité de la population, c'est-à-dire le nombre de levures actives par rapport au nombre de levures isolées, est atteint quand le milieu renferme 11° d'alcool.

Après un mois de conservation, l'examen des cultures dans les tubes de moût de raisin a permis de faire les constatations suivantes :

1° On n'a jamais noté la présence d'un voile ou d'une pellicule. Certaines souches ont formé un léger anneau, déposé au-dessus du liquide, le long de la paroi du tube.

2° Tous les tubes présentent un liquide parfaitement clair, et un dépôt bien ramassé au fond.

3° Les temps de latence ont peu varié avec les cultures ; ils sont courts et voisins de 48 heures (fig. 3).

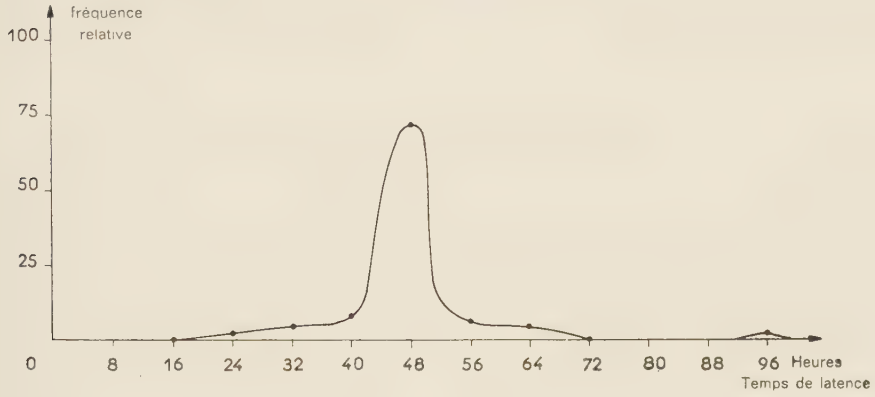


Fig. 3. — *Histogramme des temps de latence de fermentation des souches*

4° L'étendue de variation des durées de fermentation est plus large. Pour certaines souches ces durées sont très courtes : 4 à 6 jours, pour d'autres elles sont longues allant jusqu'à 28 jours. La moyenne est de 12,6 jours avec un écart type égal à 3,7 jours.

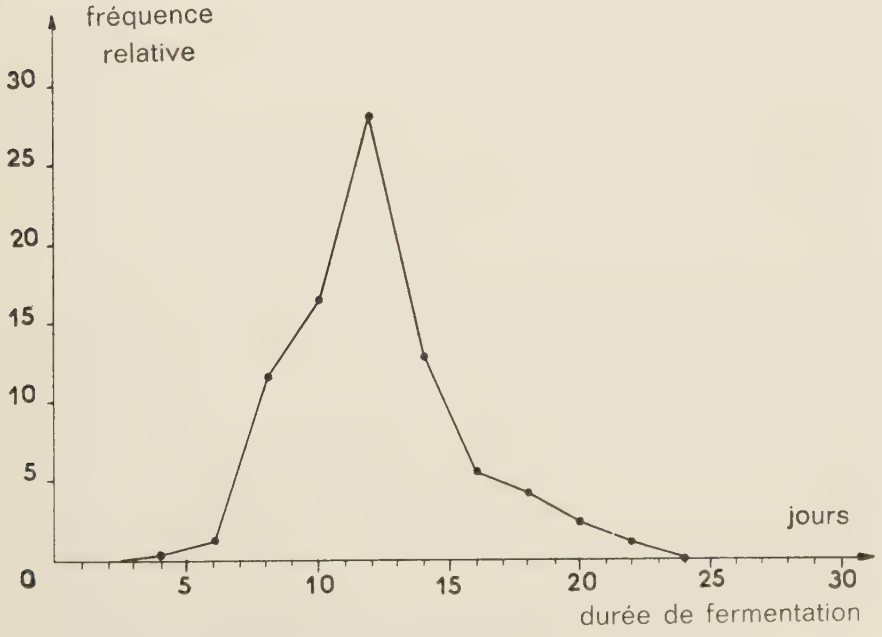


Fig. 4. — *Histogramme des durées de fermentation des souches.*

Statistiquement, il n'y a pas de corrélation simple entre la durée de fermentation des clones dans les tubes et le degré alcoolique d'isolement.

En résumé, toutes les souches isolées sont actives, elles font fermenter les sucres plus ou moins rapidement et, dans l'ensemble, les vins se clarifient assez vite. Ce sont donc des levures convenables pour les essais de sélection.

CHAPITRE III

SELECTION DES SOUCHES

Parmi les 290 souches isolées il fallait reconnaître celles qui convenaient à l'élaboration du vin de Monbazillac et éliminer les autres. Pour cela, chacune des souches a été ensemencée dans un faible volume de moût préalablement stérilisé. L'examen des moûts fermentés a permis une première élimination de levures, basée essentiellement sur la valeur du degré alcoolique atteint. C'est ce que nous appellerons la première sélection.

Dans un deuxième temps, les levures non éliminées dans la première sélection ont subi un nouveau choix après fermentation dans un volume plus grand de moût pasteurisé (et non stérilisé). C'est ce que nous appellerons la deuxième sélection qui nous permettra, d'une part, de vérifier la constance des qualités alcoogènes des souches et aussi d'apprécier, très approximativement, les qualités organoleptiques des produits de leur fermentation.

A. Première sélection.

On prépare d'abord un levain de chaque clone en ensemençant dix millilitres de moût de raisin stérile avec un fragment de culture sur gélose. Ce levain sert à ensemencer 100 ml de moût stérile, additionné de 1 % d'eau de levure et contenus dans un ballon bouché par un tampon de coton.

Le moût utilisé titrait 260 g de sucres réducteurs et son acidité correspondait à 4 g H_2SO_4 par litre. Cette richesse saccharine risquait d'être insuffisante pour un certain nombre de souches, ayant été isolées aux degrés les plus élevés. Nous avons donc chaptalisé une partie du moût en amenant à 300 g l la teneur en sucres réducteurs, l'acidité restant la même.

Les ballons étaient conservés à l'étuve à 25° C et agités deux fois par jour jusqu'au départ de la fermentation. Dès ce moment les tampons de coton furent remplacés par des bouchons de caoutchouc trempés dans l'alcool à 95° et flambés, munis chacun d'un tube recourbé et stérile servant de manomètre. Les tubes contenaient quelques gouttes d'eau stérile. Ce dispositif permet de protéger le milieu contre une aération excessive et d'observer l'intensité du départ du gaz carbonique. Il permet aussi d'éviter des pertes d'alcool par évaporation dans l'étuve (fig. 5).

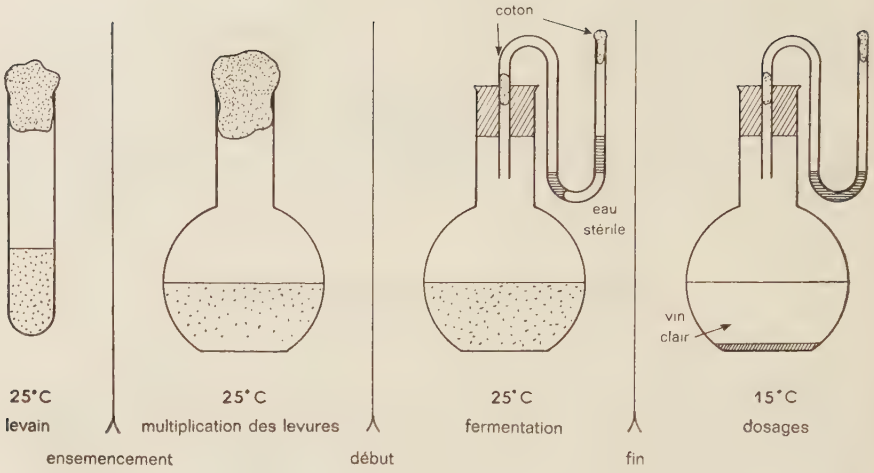


Fig. 5. — *Stades de la première sélection.*

Dans cette première sélection l'appréciation des souches est basée sur les caractères suivants :

— degré alcoolique,

— acidité volatile produite,

— rendement alcoolique.

Cependant certaines souches ont été éliminées pour d'autres raisons : durée de fermentation trop longue, ou clarification trop lente.

Les dosages de l'alcool et de l'acidité volatile n'ont été effectués que sur des liquides parfaitement limpides.

1. *Degré alcoolique.*

Les degrés alcooliques atteints sont différents suivant qu'il s'agit de clones ensemencés dans le moût non chaptalisé ou dans le moût chaptalisé.

a) *Essais dans le moût naturel* (non chaptalisé). — Y ont été ensemencées les souches isolées au début de la fermentation du moût avant que celui-ci ait atteint 11°.

L'histogramme de la figure 6 montre que les levures isolées forment deux groupes de clones. Les individus du premier groupe sont peu nombreux et ont un pouvoir alcoogène moyen. La moyenne des degrés atteints est de 6°8. Ce groupe comporte un *Kloeckera africana* et un *Torulopsis bacillaris*. Ce sont les derniers représentants des levures "sauvages" dont la population dominait vraisemblablement au début de la fermentation. La faiblesse de leur nombre s'explique par le fait que les premiers isolements ont débuté avec un moût titrant déjà 6° d'alcool.

Les individus du deuxième groupe sont des levures elliptiques. Parmi elles figurent un *Saccharomyces fructuum* et 17 *Saccharomyces cerevisiæ* var. *ellipsoideus.*

Le degré alcoolique moyen de cette population est de 12°9.

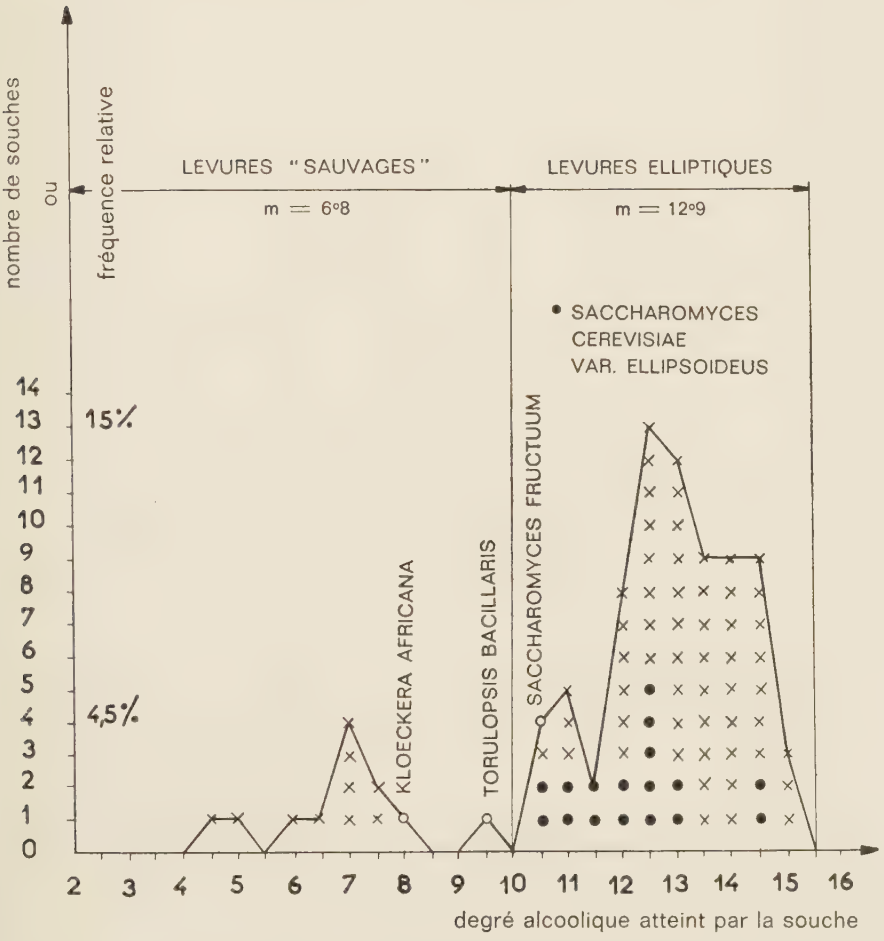


Fig. 6. — *Histogramme des degrés atteints par les souches isolées entre 6° et 10°2, développées sur moût non sucré.*

b) *Essais dans le moût chaptalisé.* — Les souches ensemencées dans ce moût ont été isolées vers la fin de la fermentation, c'est-à-dire à partir du moût primitif contenant au moins 11° d'alcool. Assez curieusement ces souches ont atteint des degrés alcooliques nettement inférieurs aux précédents. Ils s'étalent entre 7 et 11° (fig. 7).

Nous pensons que le sucre, à forte dose, étant lui-même antiseptique, l'arrêt prématuré de la fermentation peut être imputable à l'action conjointe de l'alcool et du sucre. N.S. Ohremenko a montré

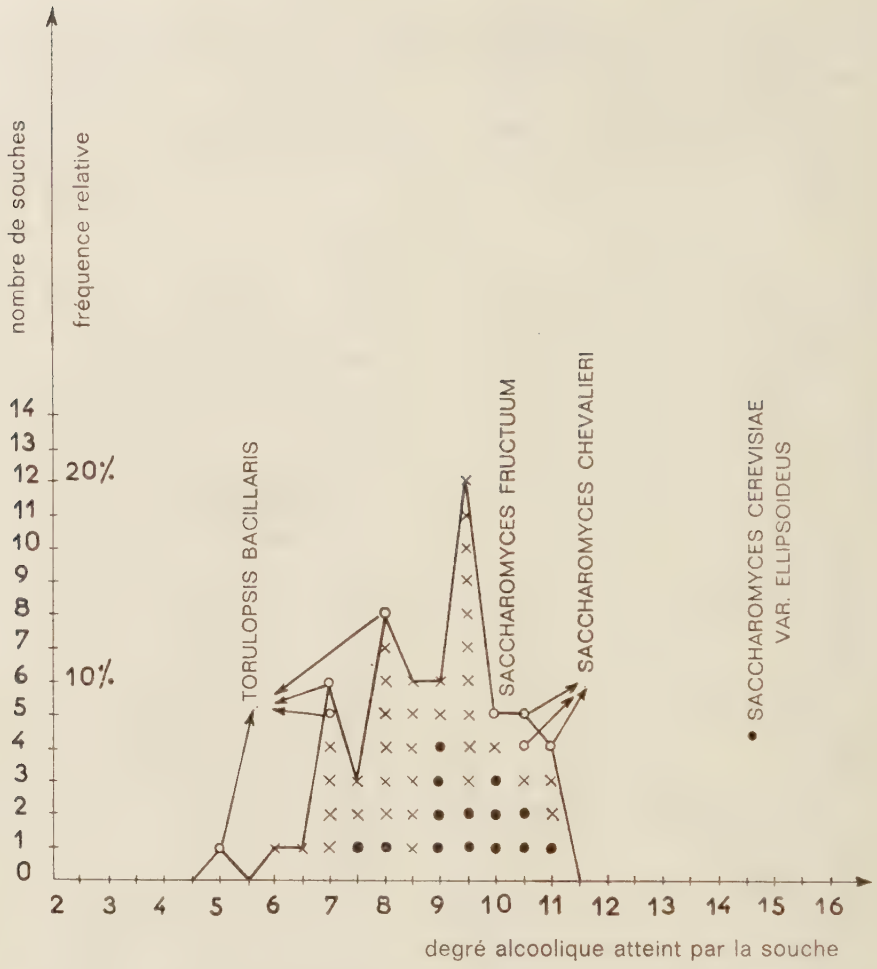


FIG. 7. - *Histogramme des degrés atteints par les souches isolées entre 10°2 et 13°2, développées sur moût chaptalisé.*

que cette action était un facteur important dans la stabilité biologique des vins (9).

On trouve, comme avec les souches ensemencées sur moût non sucré, que les levures les moins alcoogènes sont des *Torulopsis bacillaris*, et que les plus alcoogènes sont des *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. fructuum* et *S. chevalieri*. Dans l'ensemble ces vins se sont clarifiés lentement et imparfaitement.

Il faut remarquer que les levures intéressantes pour la Cave de Monbazillac sont celles qui atteignent sans le dépasser un degré alcoolique compris entre 11,5 et 12°. Elles sont peu nombreuses. On trouve, par contre, un nombre plus grand de levures qui atteignent un degré alcoolique compris entre 12 et 13°.

2. *Acidité volatile.*

Les histogrammes dans le cas du moût chaptalisé et du moût non chaptalisé étant semblables, les résultats furent assemblés en un même graphique (fig. 8).

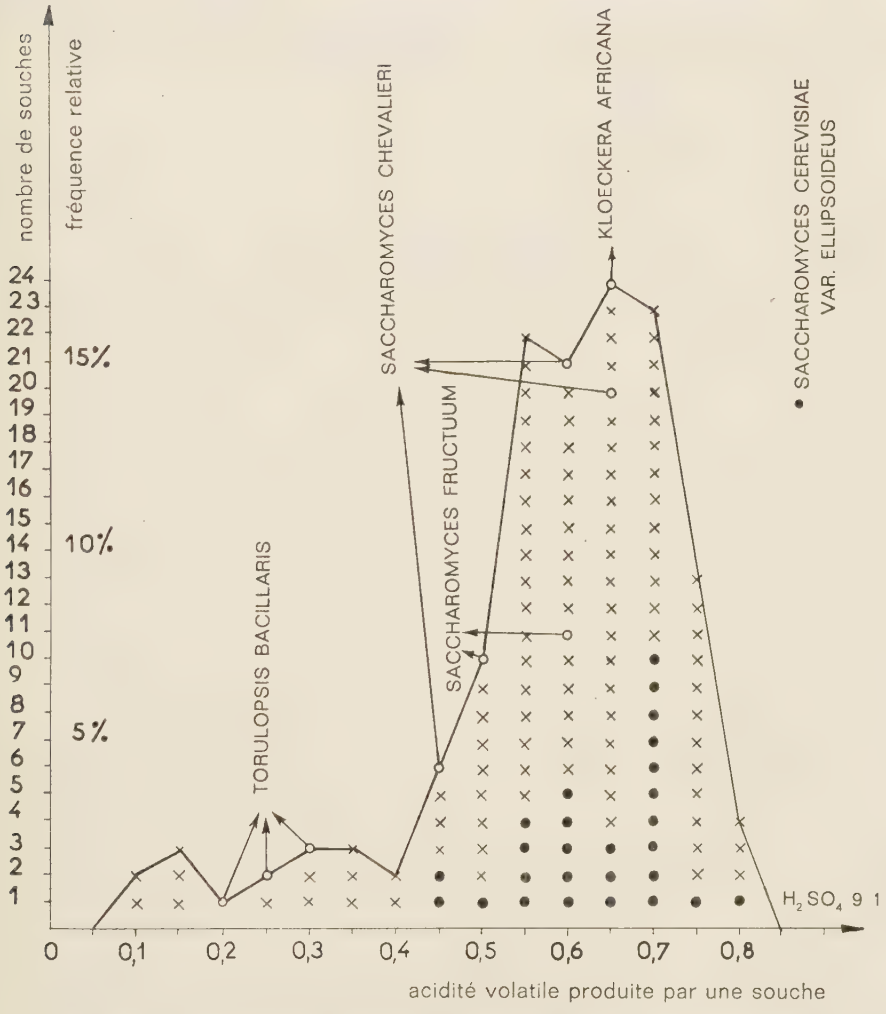


FIG. 8. — *Histogramme des acidités volatiles produites par les souches.*

L'acidité volatile formée a varié de 0,40 à 0,80 g H_2SO_4/litre. Elle est donc restée moyenne. Les plus faibles acidités correspondent aux plus faibles degrés alcooliques.

Certaines souches de *Torulopsis bacillaris* ont produit une quantité d'acides volatils particulièrement faible : 0,20 à 0.30 g H_2SO_4/litre.

Les souches ayant atteint un degré alcoolique convenable, mais ayant formé une acidité volatile trop grande, ont été éliminées.

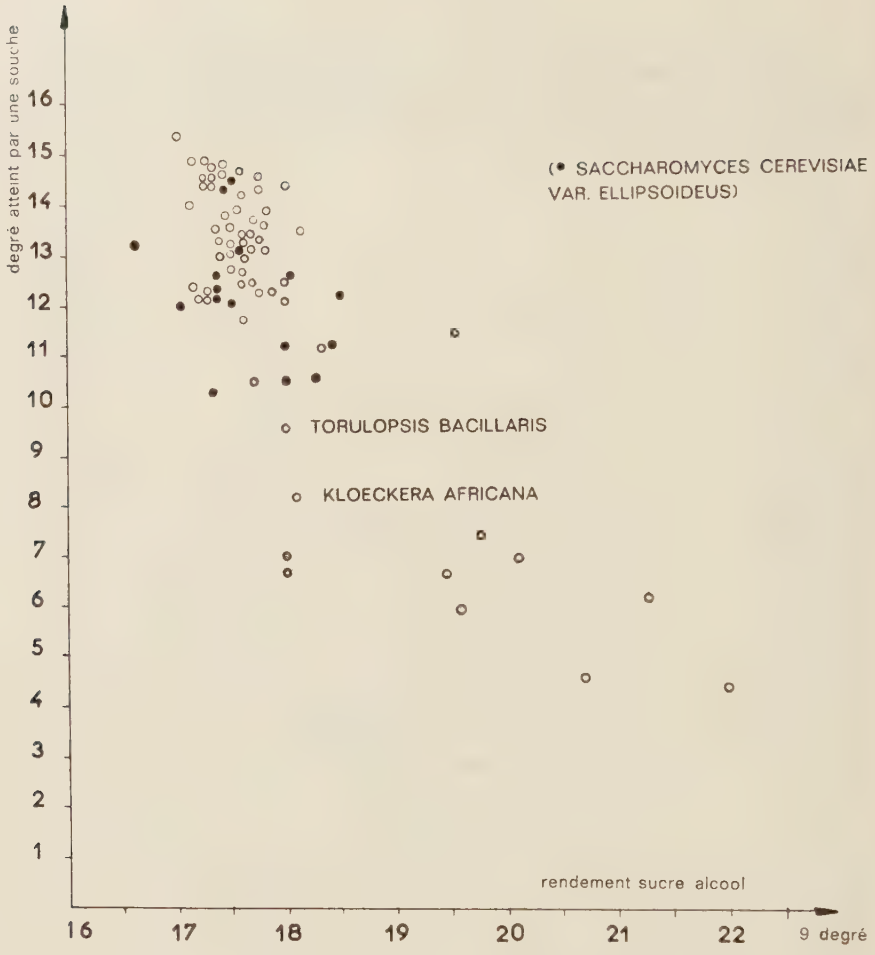


Fig. 9. — *Relation entre rendement et degré alcoolique atteint pour les souches développées sur moût non sucré.*

3. *Rendement.*

Le rendement n'a été déterminé que pour les souches cultivées sur moût non sucré. Avec le moût chaptalisé la précision est trop faible pour que l'on puisse en tenir compte.

Le rendement des souches ayant atteint 11,5 à 12° varie autour de 17.4 grammes de sucres réducteurs par degré d'alcool produit.

La figure 9 montre la répartition des souches suivant leur rendement et leur pouvoir alcoogène. On peut dire qu'en règle générale plus les degrés alcooliques sont élevés, meilleur est le rendement.

*
**

Cette première sélection nous a permis, grâce à l'examen de leurs caractères de fermentation, d'écarter un certain nombre de souches et d'en garder d'autres. Le nombre de ces dernières étant réduit, nous avons pu étendre le second essai à certaines levures qui ont atteint soit des degrés inférieurs à 11,5°, soit supérieures à 12°.

Les tableaux ci-dessous résument les caractères des souches retenues pour l'essai suivant (tabl. II et III).

TABLEAU II

Caractères des vins obtenus lors de la première sélection par les levures sélectionnées (moût non sucré)

Numéro du clone	Degré	Sucre	Acidité volatile	Rendement	Observations
VS 3	6°89	114	0,15	21,19	
YP 7	8°17	112	0,64	18,11	
WO 3	9°37	92	0,18	17,92	
VN 9	10°38	80	0,55	17,34	
VW 11	10°48	—	0,51	—	souche très peu active
WX 14	10°88	62	0,46	18,29	
WA 6	11°17	69	0,50	17,99	
WB 11	11°20	55	0,56	18,30	
YH 9	11°36	51	0,56	18,40	croissance lente sur moût de bière gélosé
VS 5	11°65	—	0,68	—	vigueur faible
WX 3	12°05	53	0,68	17,17	
ZV 6	12°07	50	0,61	17,40	
XQ 4	12°28	34	0,68	18,40	
XO 15	12°33	45	0,61	17,43	
WA 5	12°56	41	0,59	17,42	
XI 10	12°61	33	0,54	18,00	
VC 1	12°72	36	0,46	17,61	croissante lente sur moût de bière gélosé
YE 7	12°84	37	0,65	17,37	
YO 10	13°11	31	0,54	17,46	
YY 11	13°12	32	0,66	16,69	
XK 13	13°34	26	0,51	17,54	
XN 12	14°41	8	0,72	17,48	
XM 14	14°42	10	0,65	17,33	

TABLEAU III

Caractères des vins obtenus lors de la première sélection par les levures sélectionnées (moût sucré)

Numéro du clone	Degré	Sucre	Acidité volatile	Rendement	Observations
TQ 8	6°93	182	0,45	—	
QR 1	7°02	172	0,31	—	
PA 15	7°18	172	0,57	—	
TH 8	7°35	162	0,58	—	
TN 10	7°44	166	0,53	—	
RL 9	7°76	160	0,60	—	durée de fermentation longue
TP 6	8°21	160	0,73	—	
TX 6	8°21	158	0,73	—	
TF 5	8°21	162	0,53	—	
SF 1	8°37	161	0,73	—	
RY 4	8°37	164	0,60	—	
TP 4	8°44	157	0,70	—	
TK 10	8°72	144	0,63	—	
TG 14	8°72	144	0,51	—	
TO 3	8°83	153	0,89	—	
TK 15	8°84	162	0,58	—	
SE 15	8°87	140	0,82	—	
SP 8	8°98	142	0,68	—	
RL 11	9°46	132	0,70	—	
SK 10	9°64	133	0,68	—	
TX 8	9°66	93	0,55	—	
RR 5	9°67	129	0,76	—	
SQ 2	9°71	130	0,78	—	
RC 14	9°83	132	0,73	—	
RB 5	9°91	132	0,70	—	
RY 5	9°96	115	0,57	—	développement lent
SS 4	10°	131	0,70	—	
QW 2	10°07	120	0,62	—	
SQ 10	10°26	117	0,70	—	
SP 1	10°26	118	0,56	—	
SJ 4	10°35	122	0,73	—	
TZ 13	10°38	83	0,70	—	
RU 11	10°39	120	0,43	—	
RP 11	10°76	117	0,60	—	
RC 9	10°82	114	0,80	—	
RQ 11	10°84	112	0,65	—	
QV 8	10°92	109	0,70	—	

(Pour toutes ces souches, la clarification du vin a été difficile.)

B. **Deuxième sélection.**

Rappelons que cette dernière sélection devait permettre, d'une part, de vérifier la constance des caractères des souches observées dans la première sélection et, d'autre part, de fournir une appréciation organoleptique des vins produits.

Pour cela, des bouteilles d'une contenance de 2 litres environ, préalablement stérilisées au four Pasteur, reçoivent chacune 1,75 l de moût. Ce moût est alors pasteurisé avec ses lies par un séjour de 45 minutes au bain-marie porté à 80°. L'efficacité de la pasteurisation a été vérifiée en maintenant pendant 2 mois et à 25° un certain nombre de bouteilles ainsi préparées. Aucune d'elles n'a présenté de signe d'altération.

La teneur en sucre du moût, qui était de 260 g/l, a été portée à 300 g/l par chaptalisation.

Pour nous rapprocher à la fois des conditions réelles de vinification des vins doux, et aussi des conditions désirables pour l'évolution du vin, une première addition de 75 mg/l de SO_2 a été faite au moût pasteurisé sous la forme d'une solution aqueuse du commerce à 24 %. D'autres additions auront lieu à l'occasion des soutirages, de sorte que le vin fait aura reçu un total de 225 mg/l de SO_2. Les moûts sont ensemencés avec une partie du contenu des ballons du premier essai. Le système de fermeture des bouteilles fut le même que celui des ballons du premier essai. Elles ont été conservées dans une chambre isotherme à 28° C environ.

A la fin de la fermentation le vin est laissé sur lies, puis soutiré stérilement lorsqu'il est clair. Il reçoit à cette occasion une nouvelle dose de 100 mg/l de SO_2. Au cours d'un second soutirage qui précédera de peu la mise en bouteilles, il recevra 50 mg/l de SO_2 supplémentaires.

On a évité des pollutions éventuelles au moment du soutirage grâce à un montage comprenant des tubes en verre, des tubes en caoutchouc et des bouchons de caoutchouc, tel qu'il est représenté dans la figure 10. La position latérale de l'ouverture d'aspiration du liquide permet de soutirer le liquide sans mettre en suspension le dépôt au fond de la bouteille. L'ensemble est monté sur deux bouteilles sèches et stérilisé pendant 25 minutes à 105° C à l'autoclave. Au moment de procéder au soutirage on remplace aseptiquement les deux bouteilles, d'une part, par la bouteille contenant le vin à soutirer et, d'autre part, par une bouteille stérilisée au four Pasteur, celle-ci ne contient pas d'eau de condensation. L'appareil est alors relié à une trompe à vide. L'écoulement du vin est réglé à volonté par une pince de Mohr placée sur un tube de caoutchouc. Les bouteilles stériles qui reçoivent le vin soutiré sont bouchées par un bouchon de liège maintenu préalablement dans l'eau bouillante pendant 5 minutes. Le même système de soutirage nous a servi à emplir stérilement une bonbonne de 25 litres.

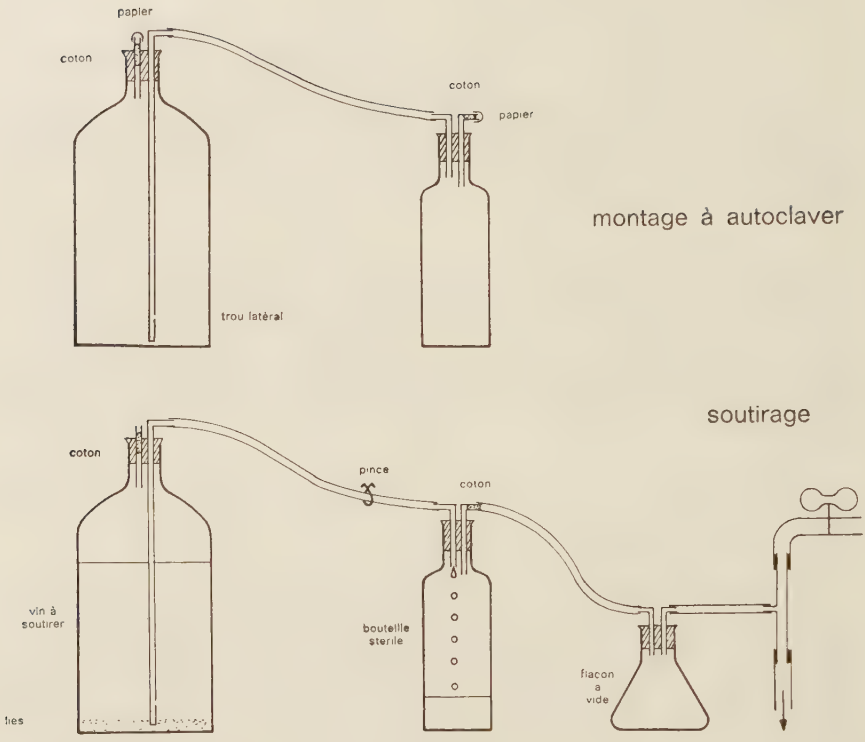


Fig. 10.

Nous avons obtenu ainsi, pour chaque souche, deux bouteilles de 75 cl de vin fait. Le vin de l'une a été utilisé rapidement pour une analyse immédiate et une première dégustation. L'autre a été conservée entre 15 et 18° C pendant 5 à 6 mois, au bout desquels les vins ont été soumis à un nouvel examen organoleptique.

Les résultats analytiques et ceux des examens organoleptiques sont réunis dans le tableau IV.

*
**

Un certain nombre d'observations d'inégale importance, mais dont certaines sont essentielles, a pu être fait sur les vins soutirés. En voici les plus importantes :

1° Dans aucune bouteille, certaines conservées pendant un an, on n'a pu observer des signes de refermentation. Dans quelques-unes, ayant reçu un vin imparfaitement clair à la mise en bouteilles, un dépôt de levures s'est rassemblé au fond. On peut donc dire que les vins n'étaient pas exempts de levures mais que celles-ci étaient incapables de les remettre en fermentation malgré la présence de sucre résiduel.

TABLEAU IV

Caractères des vins obtenus lors de la deuxième sélection par les levures sélectionnées

Numéro du clone	Degré	Sucre	Acidité volatile	Examen organoleptique
VS 3	5°25	—	—	odeur bonne
YP 7	7°11	—	—	fin
WO 3	5°88	146	—	goût de moût, sans arôme, amer
VN 9	8°74	—	—	amer, odeur bizarre
VW 11	13°01	30	0,59	doux, assez bon, assez moelleux
WX 14	13°62	—	—	— —
WA 6	12°61	38	0,55	fruité, assez moelleux
WB 11	12°82	—	—	goût commun, assez acide
YH 9	12°07	44	0,55	bon, frais, arôme agréable
VS 5	13°78	—	—	doux, commun
WX 3	13°80	—	—	arôme original, goût spécial
ZV 6	14°80	—	—	très sec, très amer
XQ 4	12°29	43	0,69	très monbazillac, bon
XO 15	13°90	18	0,59	arôme fort, amer, pas assez doux
WA 5	12°10	45	0,65	fruité, moelleux
XI 10	14°40	—	—	très alcoolisé
VC 1	12°13	43	0,67	agréable, assez moelleux
YE 7	13°62	—	—	parfumé, assez agréable
YO 10	13°86	—	—	parfumé, bon goût, agréable
YY 11	12°16	43	0,65	fruité, assez bon
XK 13	13°22	24	0,76	arôme bizarre, goût déplaisant
XN 12	14°15	—	—	très sec
XM 14	14°17	—	—	très alcoolisé, ordinaire
TQ 8	5°23	—	—	— —
QR 1	5°06	—	—	— —
PA 15	5°22	—	—	sans arôme, goût de moût
TH 8	9°61	126	—	amer, astringeant, piquant
TN 10	10°88	110	0,64	pas assez vineux
TX 6	10°35	—	—	arôme médiocre, goût de moût
TF 5	10°35	—	—	goût de miel, agréable
SF 1	12°92	—	—	odeur de renard
RY 4	11°65	—	—	assez bon, mais goût d'hybride
TP 4	10°62	—	—	agréable, arôme fin
TK 10	10°73	113	0,75	peu vineux
TG 14	10°16	110	—	parfum alcoolisé
TO 3	9°17	—	—	parfumé, goût d'hybride
TK 15	11°85	93	0,49	odeur de raisin, bon, sucré
SE 15	11°12	87	0,69	arôme assez fin
RL 11	10°95	—	—	bon, parfumé, fin
SK 10	10°25	—	—	parfumé, amer
TX 8	11°	—	—	assez bon, manque de vinosité
RR 5	10°72	—	—	amer
SQ 2	11°45	—	—	goût d'hybride, odeur de renard
RC 14	9°08	—	—	odeur de renard
RB 5	12°06	—	—	—
RY 5	11°13	—	—	amer
SS 4	11°37	—	—	bon, arôme d'eau-de-vie, équilibré
QW 2	12°08	—	—	— —
SQ 10	10°28	—	—	— —
SP 1	11°34	—	—	parfumé, assez amer
SJ 4	12°06	—	—	doux, goût bizarre
TZ 13	8°94	—	—	pas assez vineux
RU 11	11°33	—	—	parfumé, goût d'hybride
RP 11	11°91	—	—	— —
RC 9	12°23	—	—	goût d'écorce d'orange, original
RQ 11	11°05	—	—	— —
QV 8	9°80	—	—	peu vineux

2° Les degrés atteints par les différentes souches sont sensiblement supérieurs à ceux obtenus dans l'essai de première sélection. A cela rien d'étonnant : le moût ayant servi à la deuxième sélection, simplement pasteurisé, était plus riche en composés azotés. Il a fermenté en présence des bourbes, souvent remises en suspension par agitation. Les moûts stérilisés de la première sélection étaient, au contraire, parfaitement dépouillés et limpides.

3° Les acidités volatiles ont varié dans le même sens que les degrés alcooliques.

4° Les caractères organoleptiques des vins à la dégustation ont permis de constater des différences sensibles entre les vins obtenus avec les différentes souches. Ces différences ont porté sur la finesse, l'arôme et le moelleux. Nous entendons par moelleux ce qui donne au vin son "volume".

*
**

Les dégustations faites en présence de M. Géraud-Jardel, Directeur de la Cave Coopérative des Grands Vins Blancs de Monbazillac et de M. X., Chef de la Cave, ont permis un nouveau choix de souches à retenir.

Le tableau V suivant groupe les 8 souches qui, par leur comportement et la qualité de leurs vins ont paru les plus intéressantes pour les vins de Monbazillac.

TABLEAU V

Souches sélectionnées

Numéro du clone	Expérimentation en ballons			Expérimentation en bouteilles de 2 litres			
	Degré	Sucre	A. vol.	Degré	Sucre	A. vol.	Caractères organoleptiques
VS 3	6°89	114	0,15	5°23			odeur bonne
YP 7	8°15	112	0,64	7°11			fin
YH 9	11°36	51	0,56	12°07	44	0,50	arôme agréable, bon, assez acide
WA 6	11°17	59	0,50	12°61	38	0,55	fruité, assez moelleux
XQ 4	12°28	34	0,68	12°29	43	0,69	très Monbazillac, bon
WA 5	12°56	41	0,59	12°10	45	0,65	fruité, moelleux
VC 1	12°72	36	0,46	12°13	43	0,67	agréable, assez moelleux
YY 11	13°12	32	0,66	12°16	43	0,65	fruité, assez bon

CHAPITRE IV

ESSAI DE DÉTERMINATION TAXONOMIQUE DE QUELQUES SOUCHES

Il ne pouvait être question de faire la détermination taxonomique de toutes les souches isolées ; cela dépassait de loin nos moyens et ne présentait pas vraisemblablement un très grand intérêt. Nous avons donc réduit les déterminations à 42 souches comprenant, bien entendu, les 8 souches définitivement sélectionnées et 34 souches choisies de telle sorte qu'elles représentent qualitativement les populations levuriennes isolées à tous les stades de la fermentation.

Dans nos déterminations taxonomiques nous avons été guidés par les travaux de Lodder et K. Van Rij publiés en 1952. Les observations furent de deux ordres : les premières d'ordre morphologique, les secondes d'ordre physiologique.

Observations d'ordre morphologique :

— Capacité sporogène, forme et taille des asques, nombre d'ascospores par asque ;

— Forme et dimensions des cellules végétatives et leur mode de reproduction ;

— Aspect des colonies géantes.

Observations d'ordre morphologique :

— Fermentation des sucres ;

— Absence ou présence de pellicule sur milieu liquide ;

— Assimilation des sucres.

A. Détermination des familles.

Les différents genres de levures sont rattachés à 3 familles de l'ordre des champignons. Les espèces ascosporogènes appartiennent à la famille des *Endomycetaceæ* et les espèces asporogènes sont rangées dans 2 familles des *Fungi imperfecti :* celle des *Cryptococcaceæ* et celle des *Sporobolomycetaceæ* (tabl. VI).

Capacité sporogène. — C'est la capacité sporogène des différentes souches qui nous a permis de reconnaître leur appartenance aux diffé-

TABLEAU VI

Les genres de Levures.

Famille	Sous-famille	Tribu	Genre
Endomycetaceæ	Eremascoïdeæ		Eremascus Eidam
	Endomycetoïdeæ		Endomyces Reess Schizosaccharomyces Lindner
	Saccharomycetoïdeæ	Endomycopseæ	Endomycopsis Dekker
		Saccharomyceteæ	Saccharomyces Reess Pichia Hansen Hansenula H. et P. Sydow Schwanniomyces Klocker Debaryomyces Lodder et V. Rij
		Nadsonieæ	Saccharomycodes Hansen Hanseniaspora Zikes Nadsonia Sydow
	Nematosporoïdeæ		Monosporella Keilin Nematospora Peglion Coccidiascus Chatton
	Lipomycetoïdeæ		Lipomyces nov. gen.
Cryptococcaceæ	Cryptococcoïdeæ		Cryptococcus Kutzing emend Vuillemin Torulopsis Berlese Pityrosporum Sabouraud Brettanomyces Kufferath et Van Laer Candida Berkhout Kloeckera Janke Trigonospsis Schachner
	Trichosporoïdeæ		Trichosporon Behrend
	Rhodotoruloïdeæ		Rhodotorula Harrison
Sporobolomycetaceæ			Sporobolomyces Kluyver et Van Niel Bullera Derx

rentes familles. Pour ce faire, des cultures sur moût de bière gélosé des clones ont été observées deux mois après l'ensemencement. Les observations ont été faites au grossissement 660 à l'immersion après inclusion des levures dans de la gélatine glycérinée entre lame et lamelle.

Trente-six souches sur 42 ont normalement sporulé ce qui les classe dans la famille des *Endomycetaceæ*.

L'examen de la forme des ascospores et de leur nombre par asque a permis de constater l'absence de certains genres : aucune ascospore n'a la forme d'un chapeau qui caractérise le *Saccharomyces pastori* ; elles sont rondes ou ovoïdes ce qui signifie qu'aucune n'appartient à la sous-famille des *Nematosporoïdeæ* dont les représentants sont caractérisés par des spores fusiformes. Le nombre d'ascospores par asque était le plus souvent compris entre 2 et 4.

Les six autres clones n'ont pas formé de spores, ce que nous avons vérifié à nouveau sur des cultures âgées de 4 mois et en bon état, c'est-à-dire non sèches. Comme ces souches n'ont pas montré de ballitospores on peut les rattacher à la famille des *Cryptococcaceæ*.

Tableau vii

Sporulation des souches.

Souches ayant sporulé	Souches n'ayant pas sporul
ZV 6	
YY 11 - YO 10 - YH 9 - YE 7	YP 7
XN 12 - XS 13 - XM 14 - XQ 4 - XO 15 - XI 10	
WX 14 - WA 5 - WA 6 - WX 3	WO 3
VN 9 - VC 1 - VS 5 - VW 11	UY 9
TH 8 - TF 5 - TZ 13 - TP 6	RL 9
SP 8 - SS 4 - SJ 4 - SE 15 - SQ 10	QR 1
RB 5 - RU 11 - RY 5 - RP 11	PA 15
QY 14 - QV 8 - QW 2 - QP 16	

B. Famille des Endomycetaceæ.

La famille des *Endomycetaceæ* comprend 5 sous-familles *Eremascoïdeæ - Endomycetoïdeæ - Nematosporoïdeæ - Lipomycetoïdeæ* et *Saccharomycetoïdeæ*. Cette dernière famille se divise en 3 tribus : *Endomycopseæ - Nadsonicæ* et *Saccharomyceteæ* (tabl. VI).

1. *Détermination des genres.*

a) *Mode de reproduction végétative.* — Le mode de reproduction végétative permet de ranger les souches dans les différentes sous-familles.

Les 36 souches ne se multipliant pas par scissiparité n'appartiennent ni à la sous-famille des *Eremascoïdeæ* ni à celle des *Endomycetoïdeæ*, ce qui confirme d'ailleurs l'absence de mycelium.

Dans quelques cas, certains détails du mode de reproduction permettent la séparation des genres. Ainsi les bourgeons des Saccharomyces apparaissent en un point indifférent de la cellule tandis que la tribu des *Nadsoniceæ* se caractérise par un bourgeonnement bipolaire établi sur une base plus ou moins large. Aucun cas d'un tel bourgeonnement n'a pu être constaté, aucune de nos souches n'appartient donc à cette tribu.

b) *Forme et dimensions des cellules végétatives.* — L'aspect des levures dépend de leur âge et aussi de la nature du milieu. Afin de rendre les observations comparables il est indispensable de rendre identiques les conditions de culture. Nous avons adopté le milieu et la méthode de culture de Lodder et N.J.W. Kreger Van Rij. Le milieu utilisé est l'extrait de malt.

Les levures, prélevées au moyen d'une anse de platine sur une culture sur moût de bière gélosé âgée de deux semaines, servent à ensemencer l'extrait. Après 72 heures d'incubation à 25° C, l'examen microscopique est fait entre lame et lamelle au grossissement 660. Les mensurations portent sur 20 cellules dont l'aspect est fixé par le dessin (fig. 11 et 12).

Les observations permettent de classer les 36 souches sporogènes soit dans la sous-famille des *Lipomycetoïdeæ*, soit dans celle des *Saccharomycetoïdeæ* et plus précisément dans la tribu des *Saccharomyceteæ*.

c) *Examen des cultures géantes.* — Elles ont été obtenues dans des bouteilles de Kolle de 300 ml environ, contenant chacune 60 ml de moût de bière gélosé. Dans chacune d'elles on a porté une anse de culture de levure développée sur moût de bière et âgée de 2 semaines.

Les colonies ont été examinées et mesurées au bout d'un mois de conservation à 15-18° C, et les photographies ont été prises après un ou deux mois.

Les résultats sont réunis dans le tableau VIII.

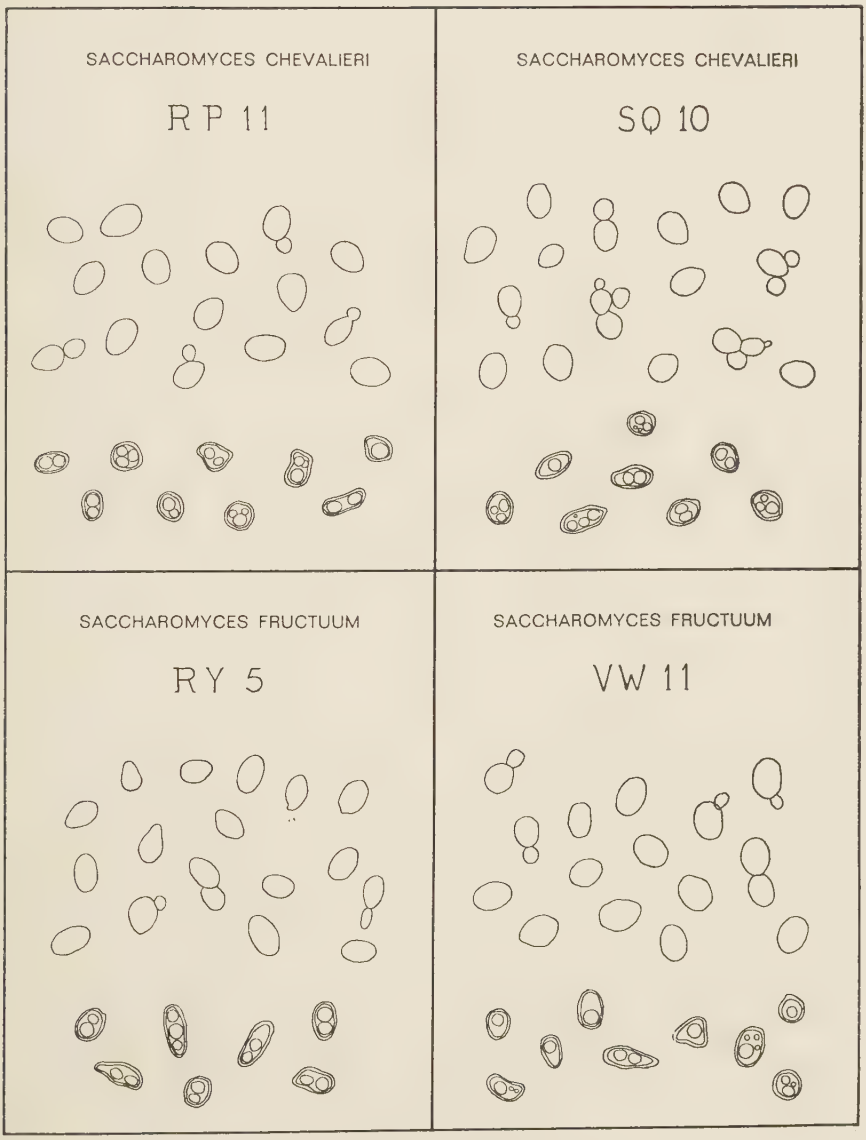


FIG. 11. — Dans chaque case : *en haut*, cellules végétatives ; *en bas*, asques (échelle 1/1000).

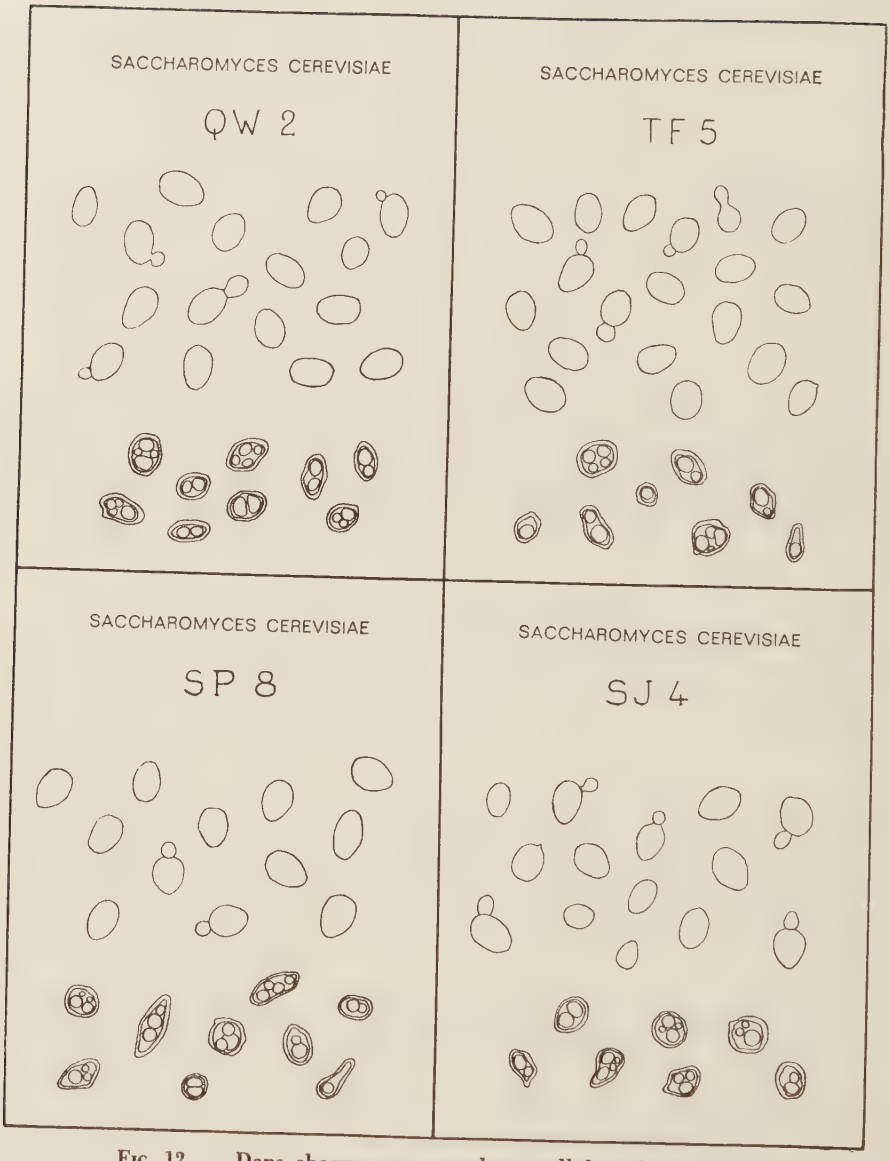


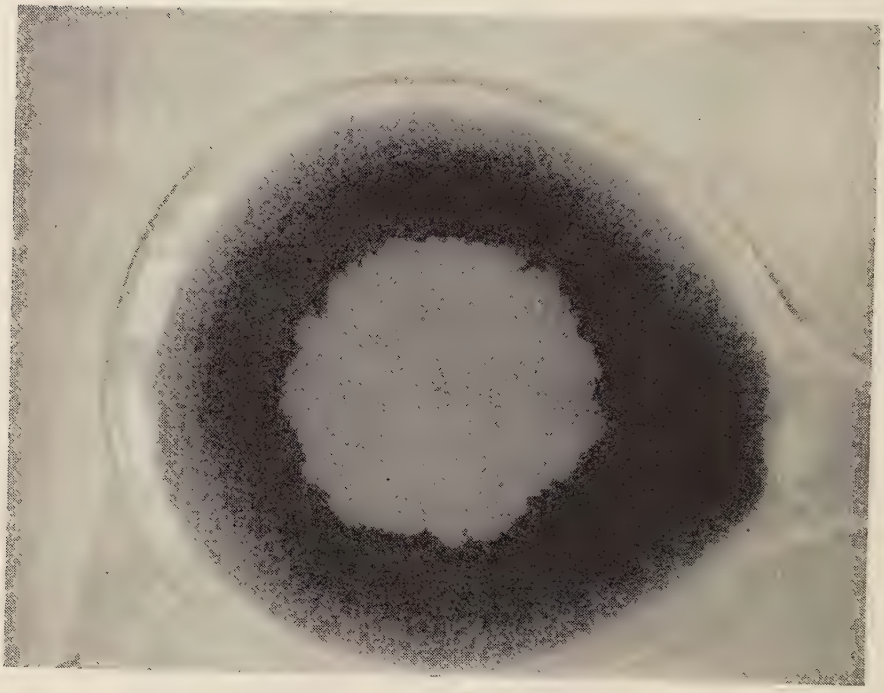
Fig. 12. — Dans chaque case : *en haut*, cellules végétatives ; *en bas*, asques (échelle 1/1000).

TABLEAU VIII

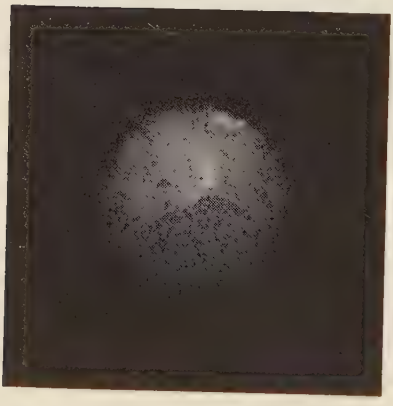
Numéro des clones	Diamètre en mm	Couleur	Relief	Centre	Bordure	Forme
SQ 10 - RP 11 - RU 11	42 à 44	blanc crème mat	ridé, stries d'accroissement visibles	à peine proéminent	très lobée	ronde
VW 11 - RY5	37 à 42	blanc crème	plis radiaux	proéminent	petites franges	irrégulière
XN 12 - YY 11 - TF 5 - TP 6 WX 14 - WA 5 - WA 6 - WX 3 SS 4 - QW 2	35 à 47	blanc mat	lisse épais	peu proéminent	. peu lobée	ronde régulière
VC 1 - YH 9	20 à 34 croissance lente	brunâtre	plat lisse	plat	fines franges	très ronde, étoilée

On peut voir que, sans nous permettre de reconnaître les genres, ces cultures ont différencié l'ensemble des souches sporogènes en quatre groupes d'individus semblables.

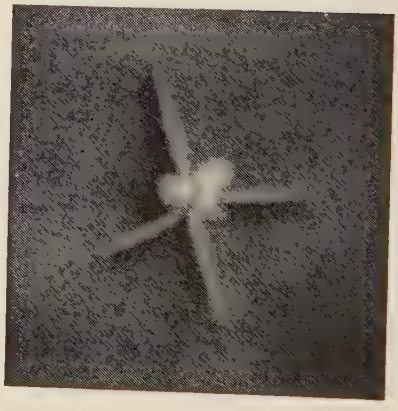
Photographies de cultures géantes



SQ10, *après deux mois de conservation.*



PA 15



YH 9

Après un mois de conservation.

d) *Fermentation des sucres.* — La propriété de faire fermenter un ou plusieurs sucres, c'est-à-dire le comportement du système enzymatique vis-à-vis des sucres, est considérée comme un caractère génétique stable pour une espèce donnée. Elle a été étudiée par de nombreux auteurs.

Les sucres suivants ont été essayés sur chaque clone :

— glucose,
— saccharose,
— maltose,
— lactose,
— galactose,
— raffinose.

Ces sucres était dissous, à raison de 2 %, dans de l'eau de levure, exepté le raffinose pour lequel la concentration était double. Le milieu, réparti dans des tubes à cloche et stérilisé à l'autoclave (15 minutes à 120° C), est ensemencé à partir d'un dépôt de culture sur milieu minéral âgé d'une semaine. Les tubes sont placés à l'étuve à 25° C et les lectures sont faites au bout de 12 jours pour les sucres autres que le raffinose. La mise en évidence de la fermentation du raffinose au 1/3, aux 2/3, ou en entier, a été faite par dosage de la quantité de sucre restant dans une culture âgée d'un mois suivant la technique préconisée par S. Domercq (3).

Comme le montre le tableau IX, toutes les souches font fermenter au moins le glucose. Elles n'appartiennent donc pas à la sous-famille des *Lipomycetoïdeæ* dont les espèces présentent une assimilation des sucres strictement oxydative. Toutes nos levures appartiennent à la tribu de *Saccharomycetaceæ*. Dans cette tribu on distingue 5 genres : *Saccharomyces, Pichia, Hansenula, Schwanniomyces, Debaryomyces* (tabl. VI).

La qualité des sucres attaqués permet de séparer deux groupes dans les levures sporogènes :

1° Groupe faisant fermenter le glucose, le saccharose, le maltose et le galactose et le raffinose au 1/3.

2° Groupe faisant fermenter le glucose, le saccharose, le galactose et le raffinose au 1/3.

Tableau ix

Levures sporogènes ; fermentation des sucres

Glucose	Saccharose	Maltose	Galactose	Lactose	Raffinose	Numéro des clones
+	+	—	+	—	+ 1/3	ZV 6 YY 11 - YO 10 - YE 7 - YH 9 XN 12 - XS 13 - XM 14 - XQ 4 XO 15 - XI 10 WA 5 - WA 6 - WX 14 - WX 3 VN 9 - VC 1 - VS 5 TH 8 - TF 5 - TZ 13 - TP 6 SE 15 - SS 4 - SJ 4 - SP 8 RB 5 QP 16 - QV 8 - QW 2 - QY 14
+	+	—	+	—	+ 1/3	RU 11 - SQ 10 - RP 11 - RY 5 VW 11

Nous pouvons dès lors conclure que deux genres de la tribu des *Saccharomycetaceæ* ne sont pas représentés dans les 36 souches sporogènes. Ce sont :

— le genre Schwanniomyces qui ne fait fermenter que le glucose et le saccharose ;

— le genre Debaryomyces dont l'assimilation fermentative des sucres est faible. Les 36 souches étudiées ont fait fermenter les sucres vigoureusement.

e) *Formation de pellicule.* — Aucune souche n'a présenté de voile ou de pellicule ni après 3 jours de culture sur extrait de malt stérile ni après un mois de conservation dans un moût de raisin.

Aucune souche n'appartient donc au genre Pichia qui, dans des solutions sucrées, donne lieu à des fermentations faibles et à la formation d'une pellicule à la surface du liquide. Le genre Hansenula forme également une pellicule en culture liquide, mais elle est parfois faiblement développée. Aussi, l'absence de cette pellicule n'est-elle pas suffisante pour éliminer ce genre. On se réfère alors à la forme caractéristique de ses spores soit en chapeau, soit en saturne avec présence d'une inclusion lipidique. Celles-ci n'ont pas été rencontrées dans nos cultures.

Les 36 souches sporogènes appartiennent donc toutes au genre Saccharomyces.

2. *Détermination des espèces du genre Saccharomyces.*

Assimilation des sucres. — Le test d'assimilation a été appliqué systématiquement à toutes les souches. La détermination des sucres assimilés par une souche du genre Saccharomyces a suffi pour connaître son nom d'espèce.

Le milieu employé est le suivant :

$(NH_4)_2\ SO_4$	5 g
$KH_2\ PO_4$	1 g
$Mg\ SO_4, 7\ H_2O$	0,5 g
Eau distillée, ... q.s.p.	1.000 ml

Ce milieu exempt de glucides est gélosé à 2 % et stérilisé à l'autoclave (15 minutes à 110° C) dans des tubes à essai. Il est ensuite fondu, puis refroidi à 40° C et coulé dans des boîtes de Pétri stériles contenant 2 ml d'une suspension de cellules du clone à étudier. Après solidification, on dépose ponctuellement sur le milieu un petit tas de sucre essayé. La boîte est conservée à l'étuve à 25° C. Si le sucre est assimilé, des colonies de levures se développent autour du tas. C'est le glucose qui a servi de terme de comparaison.

Les sucres assimilés par les 36 couches ne sont pas tous fermentés. Le critère de la fermentation a permis le classement en deux groupes.

Premier groupe : *31 clones de levures font fermenter et assimilent le glucose, le saccharose, le maltose, le galactose, et le raffinose au 1/3.*

Ces 31 souches n'assimilent pas d'autres sucres. Elles peuvent appartenir soit à l'espèce *Saccharomyces cerevisiæ*, soit à l'espèce *Saccharomyces willianus.*

La forme et le rapport de la longueur à la largeur des cellules végétatives permettent de distinguer entre les deux espèces.

Les cellules végétatives de ces 31 souches ont une forme ovale plus ou moins prononcée et le rapport longueur/largeur est toujours compris entre 1 et 2. Ces clones sont donc des *Saccharomyces cerevisiæ* (Hansen) var. *ellipsoïdeus* (Hansen) Dekker.

Voici les souches appartenant à cette espèce :
ZV 6
YY 11 - YO 10 - YH 9 - YE 7
XN 12 - XS 13 - XM 14 - XQ 4 - XO 15 - XI 10
WX 14 - WA 5 - WA 6 - WX 3
VN 9 - VC 1 - VS 5
TH 8 - TF 5 - TZ 13 - TP 6
SP 8 - SS 4 - SJ 4 - SE 15
RB 5
QY 14 - QV 8 - QW 2 - QP 16

Second groupe : *5 clones de levures font fermenter et assimilent le glucose, le saccharose, le galactose et le raffinose au tiers.*

La distinction entre les espèces de ce groupe est basée sur l'assimilation du maltose, la forme des spores, et les dimensions des cellules végétatives.

a) Les souches RY 5 et VW 11 assimilant le maltose doivent être rattachées à l'espèce *Saccharomyces fructuum* Lodder. Elle est généralement peu représentée dans les levures de vinification car son développement est lent, ce que nous avons pu vérifier dans nos cultures, en particulier pour la souche VW 11.

b) Les trois autres clones RP 11 - RU 11 - SQ 10 n'assimilent pas le maltose. La forme ronde de leurs spores et les dimensions de leurs cellules végétatives (tableau X) les font reconnaître comme des *Saccharomyces chevalieri* (Guillermond).

Tableau x

Tableau comparatif des espèces fermentant le glucose, le saccharose, le galactose et le raffinose au 1/3 et n'assimilant pas le maltose

	Spores	Dimensions	Souches
Saccharamyces chevalieri	rondes	2,5-6 × 4-10 µ	HP 11 - RU 11 - SQ 10 (5,8 × 7,8 µ)
Saccharamyces exiguus	rondes	2,5-4,5 × 3,5-7 µ	
Saccharamyces marxianus	réniformes		

C. Famille des Cryptococcaceæ.

Les techniques d'étude sont les mêmes que celles décrites pour l'identification des genres et des espèces de la famille des *Saccharomycetaceæ*.

a) *Forme et dimensions des cellules végétatives. — Caractères de la reproduction.* — La famille des *Cryptococcaceæ* se compose de trois sous-familles dont deux n'ont aucun représentant parmi nos levures. en effet, aucune des six souches non sporogènes n'a formé ni de vrai mycélium ni d'arthrospores qui caractérisent la sous-famille des *Trichosporoïdeæ*. Aucune, non plus, n'a présenté une couleur rouge due à la présence de pigments caroténoïdes propres aux représentants de la sous-famille des *Rhodotoruloïdeæ*. Ces levures appatiennent donc à la sous-famille des *Cryptococcoïdeæ* qui comprend sept genres.

Cinq des souches cultivées sur extrait de malt présentent des cellules rondes ou légèrement ovales et de dimensions réduites. Leur diamètre est compris entre 4,5 et 6 µ. Ces cellules formaient le plus souvent de petits amas ou courtes files (fig. 13). Il s'agit des souches WO 3, PA 15, RL 9, QR 1, UY 9.

Le dernier clone YP 7 présente lui aussi des cellules de faibles dimensions mais de forme un peu ovale et souvent apiculée.

b) *Cultures géantes.* — Les observations sont groupées dans le tableau XI. Elles permettent comme précédemment une séparation en groupes.

c) *Fermentation et assimilation des sucres.* — Toutes les souches asporogènes ayant fait fermenter au moins la glucose, n'appartiennent pas aux genres *Pityrosporum*, *Trigonopsis*, et *Cryptococcus* dont les assimilations des sucres sont strictement oxydatives.

Les souches se séparent en deux groupes :

— Cinq souches font fermenter le glucose, le saccharose et le raffinose au tiers. Aucun autre sucre n'est assimilé. Elles présentent des cellules petites et rondes. Ces deux caractères permettent de les identifier avec l'espèce *Torulopsis bacillaris* (Kroemer et Krumbholz) Lodder. Ce sont les souches WO 3, UY 9, RL 9, QR 1, PA 15.

— La souche YP 7 fait fermenter le glucose et assimile aussi le saccharose et le maltose. Certaines de ses cellules végétatives présentent une forme apiculée ou en citron. Les cellules mesurent en moyenne 5,2 au 6,5. Nous nous trouvons en présence d'un *Kloeckera africana* (Klöcker) Janke déjà rencontré sur des raisins de Gironde (3).

*
**

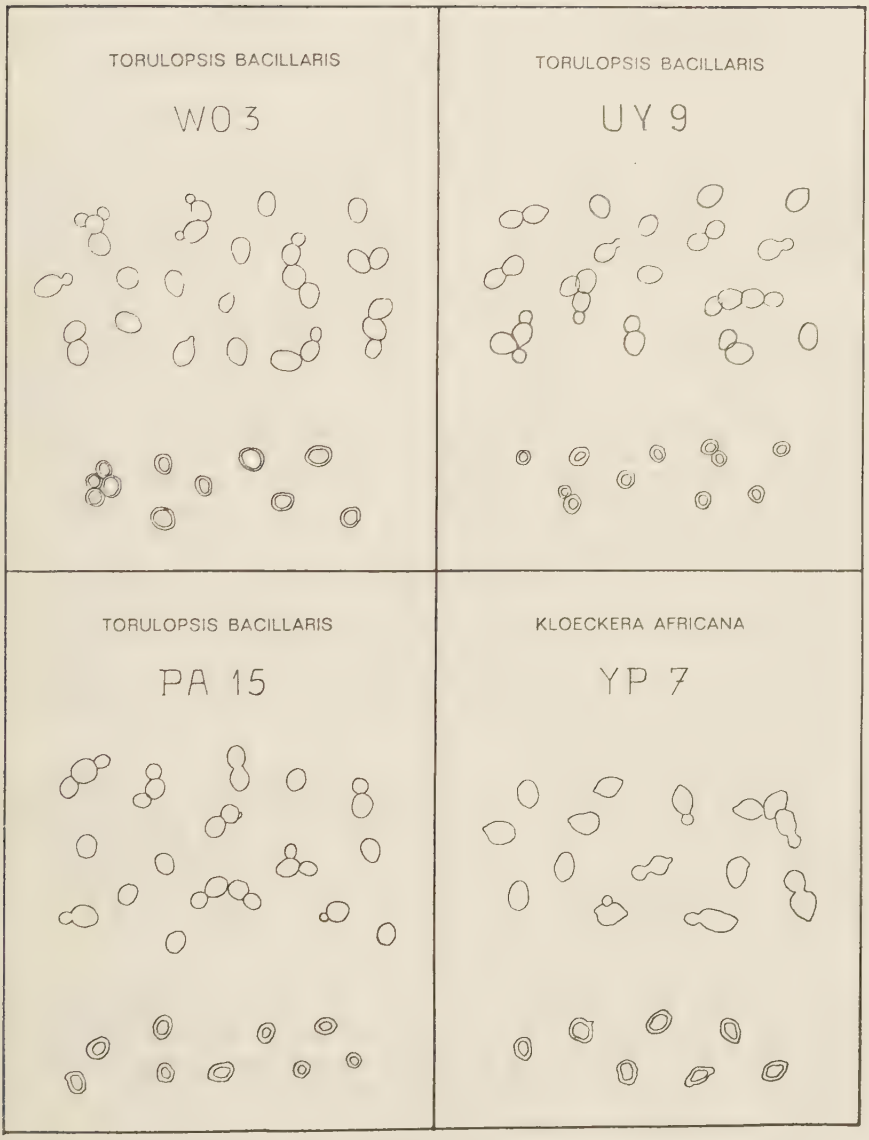


FIG. 13. — Dans chaque case : cellules jeunes, *en haut* ; cellules âgées, *en bas* (échelle 1/1000).

En résumé, parmi les 42 clones étudiés nous avons reconnu :

33 *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen) var. *ellipsoïdeus* (Hansen) Dekker ;

3 *Saccharomyces chevalieri* Guillermond ;

2 *Saccharomyces fructuum* Lodder et Van Rij ;

5 *Torulopsis bacillaris* (Kröemer et Krumbholz) Lodder ;

1 *Kloeckera africana* (Klöcker) Janke.

Le pouvoir alcoogène moyen et la quantité moyenne d'acides volatils produits par les différentes espèces sont groupés dans le tableau XII. Ils ne présentent pas de différences notables avec les observations faites sur les mêmes espèces par d'autres auteurs (10,3).

Les espèces ainsi déterminées ne se trouvaient pas dans tous les prélèvements faits sur le moût en fermentation spontanée. Certaines n'ont été trouvées que dans les prélèvements faits au début de la fermentation, d'autres enfin (et ce sont les plus fréquemment rencontrées) aux stades moyens de la fermentation. Si l'on tient compte du stade de fermentation auquel elles ont été isolées, la présence de ces espèces peut donner lieu, semble-t-il, à certaines considérations sur l'évolution des populations levuriennes au cours de la fermentation qui ne sont pas sans intérêt du point de vue technologique.

Kloeckera Africana a été isolé du premier prélèvement fait sur le moût en fermentation dont la teneur en alcool ne dépassait pas 6°. On peut considérer qu'il constitue un témoin d'une population de levures "sauvages" qui est l'auteur du départ de la fermentation. On remarquera cependant qu'il compte parmi les levures apiculées dont le pouvoir alcoogène est élevé.

La forte proportion de *Saccharomyces cerevisiæ* var. *ellipsoïdeus*, isolés à tous les stades de la fermentation mais surtout entre les stades extrêmes, est un fait normal et connu. Cette espèce est l'auteur le plus fréquent et le plus abondant de toutes les fermentation vinicoles et on sait qu'il constitue jusqu'à 80 % des levures intervenant dans les vinifications du Bordelais (10).

La présence de *Saccharomyces chevalieri* est tout aussi normale bien qu'il soit moins fréquent. Du point de vue de son comportement physiologique et, par conséquent, technologique, il est peu différent de l'espèce précédente et il se développe et agit parallèlement à celle-ci aux mêmes stades de la fermentation.

Torulopsis bacillaris est considéré comme une espèce caractéristique de la flore levurienne propre aux raisins ayant subi la pourriture noble. C'est bien le cas de la vendange dont provient notre moût et sa présence est, de ce fait, tout à fait normale.

D'autre part cette espèce n'a été isolée que du moût prélevé en fin de fermentation, c'est-à-dire d'un milieu dont la concentration alcoolique était élevée. La résistance à l'alcool relativement grande

TABLEAU XI

Levures asporogènes : cultures géantes

Numéro des clones	Diamètre en %	Couleur	Relief	Centre	Bordure	Forme
WO 3 - UY 9 - RL 9 - QR 1 - PA 15	44 à 46	blanc transparent	plat lisse	granuleux	un peu lobée, franges	ronde régulière
YP 7	37 à 39	blanc-jaune	plat mince	à peine proéminent	très divisé, bord net	assez régulière

TABLEAU XII

Espèce	Ribereau-Gayon et Peynaud (10)				Nos résultats moyens	
	Milieu aérobie		Milieu anaérobie			
	Alcool*	A. Vol*	Alcool*	A. Vol*	Alcool	A. Vol
S. cerevisiæ var. *ellipsoïdeus*	12°5	1,18	10°1	1,08	11°33	0,63
S. chevalieri	14°0	1,14	11°1	1,02	10°47	0,58
S. fructuum	12°4	1,59	9°8	1,36	10°22	0,54
Torulopsis bacillaris	10°8	0,48	7°8	0,55	7°31	0,39
Kloeckera africana	10°3*	0,40*	8°4*	0,55*	8°17	

* Résultats de S. DOMERCQ (3).

de cette espèce a été signalée par Ribereau-Gayon et Peynaud qui en fixent le seuil aux environs de 12°5 (10). Les mêmes auteurs signalent cependant qu'aucun cas de refermentation ne peut lui être attribué. Nos expériences semblent vérifier et la résistance à l'alcool et l'incapacité de refermentation de cette espèce.

La fréquence plus grande de *Torulopsis bacillaris* vers la fin de la fermentation confirme le phénomène général de succession entre espèces de plus en plus résistantes à l'alcool dans le milieu en fermentation. Au fur et à mesure que la fermentation avance et que la concentration en alcool progresse, des espèces et des souches moins résistantes disparaissent pour laisser place à des espèces et des souches plus résistantes. Vers la fin de la fermentation la population levurienne devient à la fois de moins en moins variée et nombreuse mais la proportion d'individus résistants s'accroît. C'est ainsi que la proportion de *Torulopsis* augmente vers la fin de la fermentation de notre moût d'où sa fréquence parmi les levures isolées à ce stade de la fermentation. On en conclurait trop hâtivement qu'un vin gardant du sucre fermentescible entrera fatalement en fermentation, à moins d'empêcher l'activité des levures résistantes à l'alcool par l'introduction d'antiseptique et par la pasteurisation, par exemple.

Pour provoquer la fermentation, il faut que les individus résistants susceptibles d'intervenir soient assez nombreux dans le milieu ; c'est-à-dire, qu'ils puissent se multiplier et dépasser le stade d'adaptation au milieu. Or, souvent les conditions offertes par le milieu ne leur permettent pas de dépasser ce stade. C'est ainsi qu'on a pu observer que, d'une manière générale, *Torulopsis bacillaris* ne peut pas être l'auteur d'une remise en fermentation.

Cependant on ne peut affirmer d'une façon certaine qu'aucune espèce résistante à l'alcool ne puisse dépasser le stade d'adaptation dans un vin donné. Il semble que du point de vue technologique, on doive rechercher une élimination aussi poussée que possible des levures apportées par les raisins, à titre de garantie contre le développement des plus résistantes à l'alcool.

CHAPITRE V

ESSAIS A LA CAVE

Des essais de vinification avec des levures sélectionnées furent entrepris à la Cave de Monbazillac à l'automne 1962. Il s'agit d'essais de transposition des procédés employés au laboratoire dans la pratique de vinification de la Cave, destinés essentiellement à établir les difficultés qui en résultaient et, éventuellement, les moyens de les éviter. Il était évident, en particulier, que la stérilité obtenue assez facilement au laboratoire serait difficile à réaliser dans la pratique courante de la Cave. Effectivement des difficultés devaient se produire qui rendaient les pollutions inévitables et qui ôtaient tout espoir de réussite de la fermentation avec la seule levure sélectionnée pure.

Il était aussi évident que les compositions des moûts employés au laboratoire n'étaient pas identiques à celles des moûts de la cave. Des différences profondes existent en effet entre les moûts ayant subi un chauffage dont certains constituants sont précipités et éliminés et les moûts obtenus par simple pressurage dans la cave.

La relation des essais n'est cependant pas sans intérêt. Ils ont fourni, comme on va le voir, des renseignements utiles d'ordre technologique et nous ont amenés à saisir le rôle essentiel de la richesse en substances azotées du moût sur la marche de la fermentation. Ce dernier sujet d'ailleurs fera l'objet du chapitre suivant.

*
**

La vinification habituelle pratiquée à la Cave Coopérative de Monbazillac comporte, pour l'essentiel, les opérations et phases suivantes :

— Foulage suivi immédiatement du pressurage ;

— Transport du moût vers les cuves de fermentation, pratiquement sans repos préalable ;

— Fermentation spontanée, contrôle périodique de la température et de la densité du moût ;

— Arrêt de la fermentation par traitement au gaz sulfureux ;

— Soutirage ;

— Centrifugation et stockage en cuve ;

— Clarification par le froid ;

— Pasteurisation et mise en bouteille.

On voit qu'il s'agit d'un mode de vinification simple. Mais comme toutes les vinifications, il impose un programme de travail très strict dans lequel il fallait glisser, en quelque sorte, nos essais sans en troubler le rythme et l'économie. On remarquera aussi que la fermentation porte sur des moûts pratiquement non débourbés.

Grâce à l'amabilité de M. le Directeur de la Cave, les essais de vinification avec levures sélectionnées ont pu être entrepris au moment des vendanges 1962 qui correspondait aussi à une période d'activité intense du personnel et de la Direction. Un essai a été fait avec la souche WA 5, un autre avec un mélange de 3 souches : VS 3 peu résistante à l'alcool, YP 7 d'une résistance moyenne et, enfin, WA 5 ayant résisté à 12°6 dans les essais au laboratoire. Dans le choix des souches nous étions guidés par les qualités organoleptiques des vins qu'elles avaient fournis lors de la deuxième sélection.

Vingt litres de culture furent préparés stérilement au laboratoire avec la souche WA 5 et autant avec le mélange des trois souches. Les cultures furent transportées à la cave dans des bonbonnes en verre stériles et ont servi, chacune, à la préparation d'un pied de cuve.

Faute d'installation spéciale, les pieds de cuve ont été préparés dans des bordelaises ayant contenu de l'alcool affranchies à la vapeur et égouttées.

Quatre barriques ont reçu la moitié de leur volume environ, soit 110-120 litres de moût pasteurisé à 60° en couche mince qu'il a fallu laisser refroidir avant de lui incorporer les cultures de levures sélectionnées. Ce n'est que douze heures environ après la pasteurisation que la température est descendue à 30°. Or, au bout de ce temps d'attente, le moût de deux barriques était entré spontanément en fermentation. Cela prouve amplement que les mesures d'asepsie prises étaient loin d'être parfaites sans pouvoir affirmer avec certitude qu'il s'agit d'un manque de stérilité des fûts, d'une pasteurisation déficiente ou d'une pollution après pasteurisation.

Les pieds de cuve ne furent préparés que dans les fûts dont le moût était resté calme. En même temps que l'une des levures sélectionnées, le moût de chaque barrique recevait une dose de SO_2 correspondant à 50 mg/l.

Douze heures plus tard, les pieds de cuve en pleine fermentation étaient transvasés chacun dans une cuve d'une contenance approximative de 180 hl dans lesquelles on fit arriver 100 hl de moût venant d'être pressé et sulfité à raison de 100 mg l de SO_2. Le volume du pied de cuve constituait approximativement 1 % du volume du moût.

Les deux cuves expérimentales ne pouvaient prétendre à la stérilité. Elles avaient subi cependant un détartrage récent suivi d'un affranchissement à l'aide d'une solution commerciale d'acides organiques d'un rinçage, et enfin, d'un méchage à raison de 2 g environ de soufre par hectolitre de capacité.

La tuyauterie ayant servi aux transvasements, lavée à l'eau, a été rincée avec une solution à 5 % de SO_2.

TABLEAU XIII

Résultats de l'expérimentation en cave

Date	Clone WA 5		Clones mélangés	
	Densité	Température	Densité	Température
18-10-1962	1,093	17°5	1,095	16°5
19-10-1962	1,071	22°	1,077	20°
20-10-1962	1,048	25°	1,053	24°
22-10-1962	1,018	25°	1,019	25°
23-10-1962	1,010	24°5	1,008	25°
24-10-1962	1,000	23°5	1,000	24°
25-10-1962	1,000	22°5	0,998	22°5
28-10-1962	0,996	15°	0,998	15°

Comme l'indiquent le tableau XIII et la figure 14, la fermentation a été rapide et complète et n'a pas laissé de sucre résiduel. Les vins ont atteint 13°95 et 14°, c'est-à-dire une concentration alcoolique bien supérieure à celle que les levures sélectionnées employées ont supportée au laboratoire.

Ce résultat peut être attribué à trois ordres de causes :

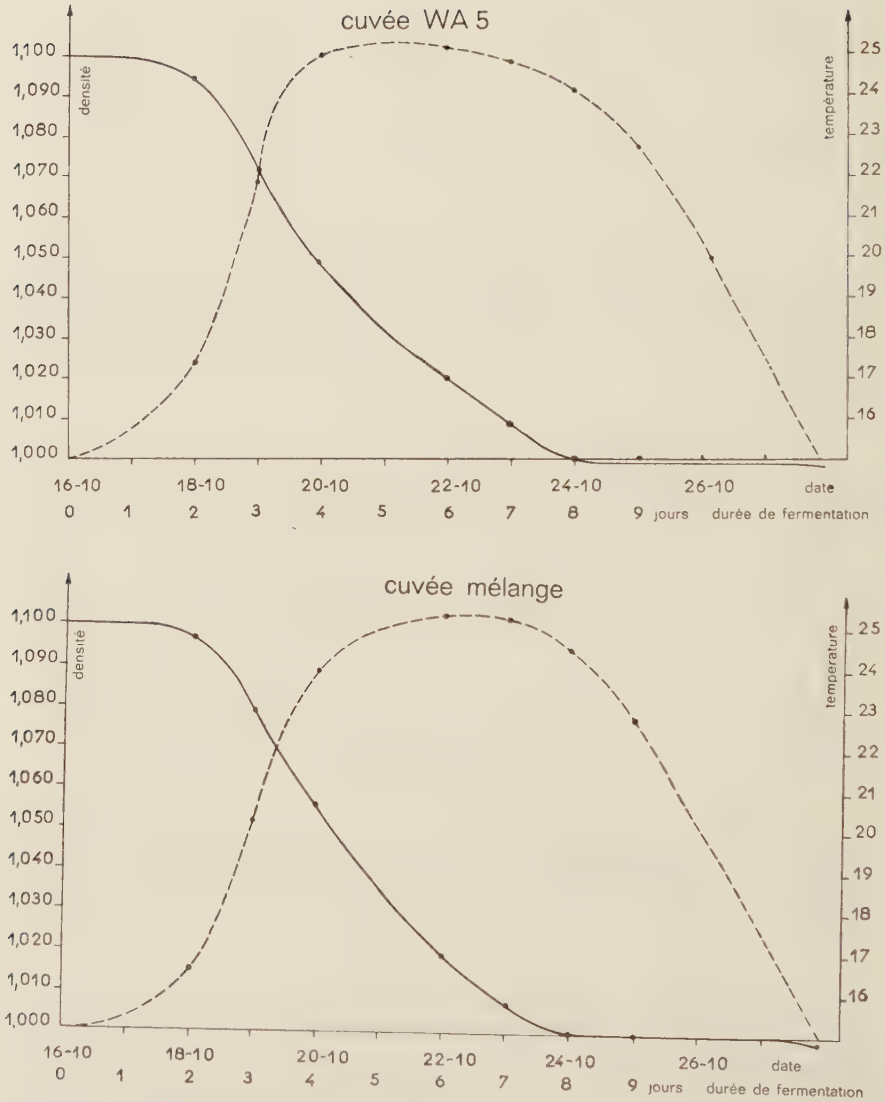
a) L'asepsie du moût a été insuffisante pour assurer la dominance de la levure sélectionnée ; les levures indigènes sont restées en nombre suffisant pour amener l'usure complète du sucre.

b) Les levures sélectionnées, en présence d'un milieu différent de celui dans lequel elles ont été sélectionnées au laboratoire, changent leur comportement vis-à-vis de l'alcool et deviennent capables d'en supporter des concentrations supérieures.

c) Les causes énumérées en *a*) et *b*) ont pu intervenir simultanément. On peut admettre, sans grand risque d'erreur, que c'est le dernier cas envisagé qui est le plus probable.

L'insuffisance d'asepsie du moût peut être due à des causes nombreuses : état pollué du matériel vinaire, pollution massive de l'atmosphère de la cave en période de vendange et de vinification due à la longue durée du refroidissement du moût nous paraît la plus importante.

On peut en conclure que pour atteindre le degré d'asepsie nécessaire pour assurer la dominance de la levure sélectionnée, des modifications profondes des techniques en usage à la cave se seraient imposées. L'introduction de telles modifications ne serait pas faciles. Elle ne paraît cependant pas impossible. Il est tout à fait concevable que l'industrie vinicole adopte des méthodes de travail analogues à celles de la Laiterie ou de la Brasserie dans lesquelles les règles d'hygiène et d'asepsie sont couramment appliquées.



– Courbe de la densité à 15° C du moût en fermentation
-- Courbe de la température du moût en fermentation

Fig. 14.

Quant au moût utilisé, sa composition était bien différente du moût utilisé au laboratoire. Or, comme il a déjà été observé (1), le comportement d'une levure, en particulier sa résistance à l'alcool, dépend de cette composition. Les différences entre les deux moûts sont celles qui se présentent entre, d'une part, un moût chauffé et fortement clarifié et, d'autre part, le même moût non chauffé et non débourbé. Les différences portent certainement sur beaucoup de composés, mais celui qui intervient de la manière la plus évidente est, sans doute la différence dans la teneur en substances azotées.

CHAPITRE VI

ESSAIS DE LIMITATION DU DEGRÉ ALCOOLIQUE DU VIN PAR LIMITATION DU TAUX D'AZOTE DU MOUT

Il n'est pas dans nos intentions d'étudier l'influence du taux d'azote sur les capacités alcoogènes des souches pures obtenues. Une telle étude dépasserait l'objectif de ce travail. Plus modestement, nous nous proposons de relater ici deux séries d'expériences qui avaient pour but la recherche de renseignements sur un mode de vinification pratique devant accompagner l'emploi des levures sélectionnées pures. A côté des règles concernant l'hygiène et l'asepsie à observer durant la vinification, cette technique devait comporter des traitements destinés à limiter, à un certain taux, la richesse en azote du milieu en fermentation. Ce sont des précisions sur ces traitements que nous cherchons à obtenir par les essais de laboratoire qui vont être relatés.

⁂

Une première série d'essais a porté sur quatre prises de vingt litres de moût, contenues chacune dans une bonbonne en verre préalablement stérilisée par traitement prolongé à l'alcool à 95°.

Le moût utilisé a été prélevé à la cave de Monbazillac vers la fin des vendanges 1962, mais à une période de forte pluviosité, la richesse n'étant que de 180 g/l, elle a été portée à 265 g/l par addition de sucre.

Les quatre prises ont reçu un même levain obtenu, par multiplication su moût stérile de la souche VN 9, d'un *Saccharomyces cerevisiæ* var. *ellipsoïdeus* qui lors de la première sélection n'a pas dépassé 10°4.

Mais le moût de chaque bonbonne a subi, avant levurage, un traitement particulier :

1° Moût chaptalisé témoin.

2° Moût chaptalisé après un léger débourbage,

3° Moût chaptalisé après pasteurisation,

4° Moût chaptalisé, collé et filtré après le départ de la fermentation.

1. *Moût chaptalisé témoin.*

Ce moût a été sulfité à raison de 75 mg/l de SO_2 par une solution à 24 % de SO_2 du commerce. Il fut alors additionné de 3 % en volume de levain de la souche VN 9. Après départ de la fermentation la bonbonne a été bouchée par un bouchon de caoutchouc muni d'un manomètre et conservée dans une chambre isotherme à 28° C.

La teneur en azote total du moût était de 312 mg/l dont 58 mg sous forme aminée et 9 mg sous forme ammoniacale.

Un mois après l'ensemencement le vin titrait 13°62 d'alcool et ne s'était pas clarifié. Il fut soutiré mais continua à fermenter très lentement. La totalité des sucres finit par être utilisée par les levures.

Deux prélèvements d'environ 1,75 l furent réalisés de manière aseptique, et le vin trouble fut placé dans deux bouteilles stériles de deux litres. Les bouteilles étaient bouchées par un bouchon de caoutchouc et un manomètre. La fermentation lente a continué dans ces bouteilles et n'a été arrêtée que par le froid. Le vin reçut alors 100 mg/l de SO_2. Les bouteilles ont été conservées à la température du laboratoire. Au début du printemps 1963 la fermentation a repris.

Le vin resté dans la bonbonne, âgé de cinq mois, a été mis en bouteilles après une nouvelle addition de 25 mg/l de SO_2. Au moment de cette mise en bouteilles le vin, qui avait reçu au total 100 mg/l de SO_2 présentait la composition suivante :

Alcool	15°32
Sucres totaux	14 g/l
Acidité totale	2,85 g H_2SO_4/l
Acidité volatile	0,60 g H_2SO_4/l
N total	84 mg/l
N aminé	0 mg/l

Deux mois après la mise en bouteilles les vins sont à nouveau repartis en fermentation.

2. *Moût chaptalisé après un léger débourbage.*

Avant d'être introduit dans la bonbonne, le moût, après avoir reçu 75 mg/l de SO_2 a été conservé dans une cuve en verre pendant 24 heures. Les grosses bourbes sont tombées au fond. Le jus le plus clair a été soutiré dans la bonbonne où il a été d'abord chaptalisé et ensuite ensemencé avec 3 % de levain.

Le moût débourbé titrait 196 mg d'azote total par litre dont 42 mg d'azote aminé et 9 mg d'azote ammoniacal. Le débourbage a donc enlevé 116 mg d'azote total dont 16 mg d'azote aminé.

La fermentation qui s'est déclarée a été moins active que dans l'essai précédent et très lente vers la fin de la fermentation. Mais un mois après son départ le vin titrait 13°05 et a continué à fermenter lentement après soutirage.

Deux prélèvements aseptiques de 1,75 l environ furent réalisés

dans les mêmes conditions que pour le moût témoin. Là aussi le vin a refermenté au printemps.

Le vin resté dans la bonbonne, âgé de 5 mois, a été mis en bouteilles après avoir reçu 25 mg/l de SO_2 ce qui portait à 100 mg/l de SO_2 la teneur de gaz sulfureux reçu.

Son analyse a donné les résultats suivants :

Alcool	14°51
Sucres totaux	33 g/l
Acidité totale	2,94 H_2SO_4 g/l
Acidité volatile	0,55 H_2SO_4 g/l
N total	103 mg/l
N aminé	2,5 mg/l

Après deux mois de garde le vin fermentait dans un grand nombre de bouteilles. On peut donc dire que la diminution de la teneur en azote du moût par débourbage a simplement entraîné un retard dans la fermentation.

3. *Moût pasteurisé et chaptalisé.*

Dès son arrivée au laboratoire, le moût a été réparti dans des bouteilles de 2 litres et pasteurisé au bain-marie à 75° pendant 45 minutes. Un dépôt s'est formé après refroidissement. Le liquide surnageant, plus ou moins limpide, a été soutiré dans une bonbonne stérilisée à l'alcool. Le moût ainsi pasteurisé, et privé de ses bourbes, a été sulfité à raison de 75 mg/l de SO_2 et ensemencé comme danus les deux essais précédents.

Le moût ainsi traité titrait 178 mg d'azote total dont 30 mg d'azote aminé et 32 mg d'azote ammoniacal. Il y a eu diminution du taux d'azote total et du taux d'azote aminé, mais le chauffage a eu pour effet d'enrichir le moût en azote ammoniacal.

La fermentation fut rapide et, vingt jours après son début, elle s'est définitivement arrêtée. Le vin obtenu titrait 12°07.

Du vin soutiré dans deux bouteilles de 2 litres, et traité par 100 mg/l de SO_2, ne s'est pas remis en fermentation, au printemps.

Après cinq mois de conservation, au moment de la mise en bouteilles et, après addition de 25 mg/l SO_2, l'analyse du vin a donné les résultats suivants :

Alcool	13°41
Sucres totaux	2,59 g H_2SO_4/l
Acidité totale	0,41 g H_2SO_4/l
Acidité volatile	123 mg/l
N total	5 mg/l
N aminé	32 g/l

Aucun cas de refermentation ne bouteille n'a été constaté par la suite.

4. Moût appauvri en azote par collage et filtrations.

Au départ, le moût séparé de ses plus grosses bourbes titrait 268 mg d'azote total dont 55 mg d'zote aminé et 9 mg d'azote ammoniacal.

Sulfités comme précédemment en ensemencée avec 600 ml de levain, les 20 litres de moût furent laissés en fermentation jusqu'à ce que le degré alcoolique atteigne 3°15. La bonbonne était alors mise au réfrigérateur afin d'arrêter ou, du moins, ralentir l'activité des levures. Après quoi, on traitait le moût avec du kieselghur à raison de 400 g/hl. Au bout de 48 heures, une grande partie de cette quantité relativement importante de terre d'infusoires s'était rassemblée au fond du récipient. Le moût fut alors filtré le plus rapidement possible sur papier sans précautions spéciales.

Le collage et la filtration ont pour effet une diminution considérable de la teneur en azote du liquide, celui-ci ne contenait plus que 44 mg d'azote total dont 18,5 mg d'azote aminé et 8,5 mg d'azote ammoniacal.

Remis en fermentation à l'aide d'une petite quantité de levain (0.05 %) le moût atteignit 4°46 alors que l'acidité était de 3,48 g/l de H_2SO_4. Il fut à nouveau réfrigéré, collé et filtré, mais ce traitement ne modifie pas sensiblement sa teneur en azote qui de 44 mg/l était descendue à 39 mg/l.

Ensemencé à nouveau, le milieu se remit à fermenter jusqu'à atteindre 4°72 et s'y stabiliser. La faible teneur en azote n'a pas permis à la levure d'aller au-delà.

Mais en augmentant cette teneur par introduction d'un composé azoté (assimilable) la fermentation reprend. C'est ainsi qu'une première addition de 20 mg/l d'azote sous forme de $(NH_4)_2\ SO_4$ l'éleva rapidement à 9°04. La fermentation s'arrêta un peu plus tard définitivement bien que la température ait toujours été maintenue à 28° C, et que le moût ait été plusieurs fois aéré.

Le vin fut clarifié par le froid au réfrigérateur, additionné de 25 mg/l de SO_2 et réparti en bouteilles. L'analyse a donné les résultats suivants :

Alcool	9°59
Sucres totaux	104,70 g/l
Acidité totale	3,67 g/l
Acidité volatile	0,53 g/l
N total	84 mg/l
N aminé	10 mg/l

En bouteille le vin s'est définitivement clarifié. Nous avons observé 2 cas de refermentation sur 9 au bout de 2 mois de conservation.

Dans le tableau XIV nous avons réuni les teneurs en azote total, aminé et ammoniacal des moûts avant fermentation et quelques résultats analytiques concernnt les vins obtenus.

***

TABLEAU XIV

Résultats de la première série d'essais

Numéro de l'essai	Traitement	Avant fermentation			Vin après cinq mois de conservation en bonbonne					
		N total	N aminé	N ammoniacale	d°	Sucres	A. t.	v. A.	N total	aminé N
1	Moût non débourbé	312 mg	58 mg	9 mg	15°32	14,8	2,89	0,60	84 mg	0 mg
2	Moût débourbé	196 mg	42 mg	9 mg	14°51	33	2,99	0,55	103 mg	2,5 mg
3	Moût pasteurisé	178 mg	30 mg	32 mg	13°41	32	2,59	0,41	123 mg	5 mg
4	Moût avant filtration	268 mg	55 mg	9 mg	9°59	104,7	3,67	0,53	84 mg	10 mg
	Moût après filtration	44 mg	18,5	8,5						

Les observations faites sur le premier essai n'ont rien d'étonnant. Cet essai reproduit, en effet, les conditions de fermentation de la cave. Il est normal que le sucre soit épuisé par une population levurienne apportée par la vendange que le levain sélectionné n'a pas réussi à dominer.

Il en est de même du deuxième essai. Exceptée la diminution de la teneur en azote par débourbage, il ne présente pas de différence avec l'essai n° 1. Cette diminution n'a pas modifié les rapports entre les populations levuriennes naturelles et introduites avec le levain.

Les conditions changent profondément avec l'intervention de la pasteurisation de l'essai 3. Les diminutions de la teneur en N qui en résultent ne sont pas très différentes de celles produites par le débourbage de l'essai n° 2. Mais la pasteurisation a détruit la population levurienne apportée par la vendange et assuré la dominance de la levure apportée par le levain.

Les collages au kieselguhr et les filtrations successives après fermentation de l'essai n° 4 ont pour effet d'amener rapidement la teneur en azote à un niveau extrêmement bas. On notera en passant l'efficacité du procédé. Dans un milieu ne contenant que 39 mg l d'azote les levures n'ont produit que 4,7 % environ d'alcool mais se remettaient à en produire chaque fois qu'on leur fournissait de l'azote assimilable. Dans la production de l'alcool c'est bien l'azote qui jouait le rôle d'élément limitant. Les additions successives de $(NH_4)_2SO_4$ n'ont pas été suffisantes pour amener le degré alcoolique à 10°4, degré atteint par la souche en cause lors de la deuxième sélection. Il aurait fallu pour cela augmenter encore la quantité d'azote apportée. Mais il s'agissait d'une quantité faible qui aurait risqué de nous faire dépasser la limite de 10°4.

Dans cet essai (n° 4) on a constaté deux cas de refermentation en bouteilles. Il est vraisemblable que les nombreuses manipulations subies par le moût et le vin ont permis certaines pollutions.

*
**

Dans une seconde série d'essais nous avons tenté de mettre en relation le niveau azoté du moût et le degré alcoolique du vin produit d'après une technique de vinification qui s'inspirait de l'essai n° 4 de la série précédente.

Nous avons dû utiliser un moût très riche en azote qui a été pasteurisé, puis stérilisé. Les caractères analytiques de ce moût limpide sont les suivants :

Acidité totale	3,44 g/l de H_2SO_4
Sucres réducteurs	270 g/l (dont 26 g en saccharose)
N total	426 mg/l
P total	275 mg l

Le moût a été réparti à raison de 2 litres dans des ballons de

3 litres. Ces ballons ont été bouchés d'abord par un tampon de coton puis, après le début de la fermentation, par un bouchon de caoutchouc muni d'un manomètre. Ils ont été conservés à 28° C dans une chambre isotherme.

Pour tenir compte de l'influence des levures sauvages dans la vinification, le moût de chaque ballon a été ensemencé d'abord avec le Kloekera YP 7. Lorsque le moût atteignait un degré alcoolique voisin de 6°, il était collé à la terre d'infusoires puis filtré. Ces opérations étaient destinées à réduire la richesse en azote du milieu.

Ensuite deux groupes furent séparés : les ballons d'un groupe furent ensemencés avec la souche VN 9, ceux de l'autre avec la souche WA 5.

A certains ballons un deuxième (à 7°5 environ) et même un troisième (à 8°5 environ) collage suivi de filtration et d'un nouvel ensemencement ont été appliqués. Les teneurs en azote des moûts ainsi traités étaient de plus en plus réduites. Le degré alcoolique montait d'une unité environ par la fermentation, collage et filtration.

Les tableaux XV et XVI montrent que le moût des ballons n'ayant subi qu'une seule filtration ont une richesse en N voisine de 250 mg/l. La teneur en N des moûts ayant subi deux filtrations tombe à 172-185 mg/l ; après une troisième filtration elle varie de 154 à 182 mg/l.

Les moûts, tous limpides, ont été ensemencés une dernière fois avec les levures respectives à chaque groupe (VN 9 ou WA 5). Après deux mois de conservation, les vins étaient clairs. Ils furent soutirés dans des bouteilles de 75 cl et analysés.

Les résultats analytiques concernant ces deux groupes de ballons ont été rassemblés dans les tableaux XV et XVI.

Ce tableau XV montre que la souche VN 9, ensemencée dans un moût titrant 6°6 et contenant 250 mg d'azote, produit un vin de 14° (ballon A). Quand le moût est légèrement plus alcoolique (cas des ballons L, D, B, C, et 1) et moins riche en azote (teneur inférieure à 180 mg/l) la levure donne un vin dont le degré ne dépasse pas 10°6. Très approximativement on peut donc dire que pour obtenir un vin de 11°5, à partir d'un moût titrant 6 à 7° la quantité d'azote du milieu doit être inférieure à 250 mg/l et supérieure à 180 mg/l. N'ayant pas dosé le degré alcoolique du moût des ballons autres que A, on ne peut donner plus de précisions.

En procédant d'une manière analogue le tableau XVI permet d'établir que pour obtenir un vin de 11°5 à partir d'un moût titrant 6 à 7° d'alcool avec la souche WA 5, la richesse azotée du milieu au départ doit être comprise entre 180 et 245 mg/l de N.

En plus, la quantité d'azote consommée par la souche WA 5, quand le degré alcoolique augmente d'une unité, se situe autour de 4,5 mg/l (tableau XVI).

Dans le ballon F, il est possible que l'arrêt de fermentation ne soit

TABLEAU XV

Résultats de l'essai n° 1 de la deuxième série

SOUCHE VN 9

Numéro du ballon	Nombre de filtrations	d° du moût	N du moût	d° du vin	N du vin	N aminé du vin	N/d° d'alcool	Sucres	A. t.	A. v.
A	1	6°63	252	13°98	184	8,4	9,2	16,5	3,92	0,67
L	2	—	182	10°21	179	0,5	—	32	3,62	1,20
D	2	—	178	8°85	169	2,1	—	70	3,62	0,56
B	2	—	171	10°26	168	4,2		57	3,77	0,56
C	3	—	165	10°59	157	2,1	—	33	4,09	—
I	3	—	154	8°42	154	0	—	91	3,43	0,24

TABLEAU XVI

Résultats de l'essai n° 2 de la deuxième série

SOUCHE WA 5

Numéro du ballon	Nombre de filtration	Degré du moût	N du moût	Degré du vin	N total mg du vin	N aminé du vin	N mg d° produit	Sucres	A. t.	A. v.
F	1	6°41	245	14°18	210	0,5	4,40	6	3,97	0,38
E	2	—	185	9°98	178	0,5	—	61	3,87	0,32
H	3	—	182	9°33	165	5	—	64	3,26	0,29
K	3	—	182	9°58	179	0,5	—	50	3,62	0,32
G	3	7°21	175	9°61	164	6	4,50	59	3,38	0,29
J	3	—	172	10°81	168	10	—	26	3,92	0,35

pas dû à une carence en azote du milieu, mais à une teneur alcoolique trop grande qui empêche la souche de continuer à fermenter.

Dans les ballons H, K et G c'est la faiblesse du taux d'azote du moût qui limite le pouvoir alcoogène de la souche. Comme nous l'avons démontré, dans l'essai n° 4 de la première série d'expériences, une addition d'azote permettrait à la souche de remettre le vin en fermentation.

Donc afin d'obtenir un vin de 11°5 il aurait fallu que le moût ait une teneur en azote égale à :

$175 + 1{,}89 \times 4{,}5 = 184$ mg/l d'N pour le ballon G (7°29)
$182 + 2{,}17 \times 4{,}5 = 191$ mg/l d'N pour le ballon H (7°88)
$182 + 1{,}92 \times 4{,}5 = 190$ mg/l d'N pour le ballon K (8°73)

Il semble donc que pour obtenir avec la souche WA 5 un vin de 11°5, la teneur en azote du moût (ayant 7° au moment de l'ensemencement) ne doivent pas s'écarter de 190 mg/l. Mais il s'agit d'une approximation très grossière qui, en plus, demanderait à être confirmée par d'autres essais.

*
**

A la suite de ces essais, on peut entrevoir une technique de vinification que nous ne pourrions proposer qu'à titre provisoire. D'autres essais sont nécessaires pour dégager une technique définitive.

Cette technique est essentiellement basée sur l'observation suivante : dans un moût amené à un certain niveau azoté et appauvri en levures, l'apport d'un levain de levures judicieusement sélectionnées permet de ne pas dépasser un degré alcoolique voulu tout en conservant une quantité appréciable de sucre.

On commencera par débarrasser le jus de raisin de ses plus grosses bourbes, ce qui diminuera fortement le taux d'azote total. Cette opération pourra être réalisée assez simplement par un débourbage ou, encore mieux, par une centrifugation.

Afin de conserver l'influence le plus souvent favorable des levures sauvages sur la qualité du vin, on laissera alors partir la fermentation spontanée et on l'arrêtera dès que le milieu aura atteint 5 ou 6° d'alcool, c'est-à-dire au moment où une grande partie de l'azote aura été consommée par les levures. Pour cela, on commencera par freiner la fermentation par le gaz sulfureux et, si possible, par le froid.

On collera ensuite, à la terre d'infusoires et on filtrera ou centrifugera. Ces opérations permettent d'atteindre un taux d'azote égal ou inférieur à celui exigé par le clone choisi pour la deuxième fermentation. On remarquera que cette technique de collage et de filtration est déjà couramment employée en brasserie et même en pratique œnologique pour la préparation des moûts de base en vue de la fabrication des vins mousseux naturels (1).

Après collage et filtration ou centrifugation et ajustement de la teneur en azote, le vin de 5 à 6° sera porté sur un levain en pleine activité préparé avec la souche sélectionnée choisie. La fermentation sera soigneusement suivie et au moment où le degré voulu sera atteint il y aura lieu de filtrer ou de centrifuger aseptiquement après avoir ajouté au vin une nouvelle dose de gaz sulfureux pour atteindre une teneur approximative de 200 mg/l de SO_2. On devra éviter de laisser le vin sur ses lies, l'autolyse des levures pouvant permettre, grâce à un apport d'azote utilisable, le déclenchement d'une lente fermentation.

Le vin pourra être gardé dans des cuves sous réserve que la conservation, comme les opérations qui lui ont précédé, se fasse dans des conditions d'asepsie suffisamment rigoureuse. Il faut avant tout, éviter qu'une levure à la fois moins exigente en azote, et plus alcoogène que le clone employé ne prenne possession du milieu.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Le problème essentiel de la production des vins liquoreux et doux est celui de la refermentation. Après avoir discuté des moyens habituels auxquels on a recours dans les caves pour éviter cet accident, nous nous proposons d'en établir un nouveau. Il consiste à faire fermenter le moût destiné à donner un vin doux par une levure sélectionnée qui ne peut résister à une concentration en alcool supérieure à celle du vin. Il est bien entendu que la levure ou les levures doivent être isolées parmi les levures qui font partie de la flore normale du cru. Nous pensons, en effet, qu'à chaque cru correspond une population qui n'est pas sans influencer sur ses caractères propres.

Notre travail a porté sur le vin de Monbazillac produit par la Cave Coopérative du même nom dont la Direction consciente de l'intérêt qu'il présentait, a bien voulu nous céder les quantités suffisantes de moût d'origine et nous a facilité, dans toute la mesure du possible, l'expérimentation en cave.

Ce travail présente deux parties distinctes. Dans une première partie comprenant les chapitres I, II, III, IV, nous décrivons les voies et techniques qui nous ont permis d'isoler à partir d'un moût de Monbazillac en fermentation 290 souches, constituant autant de clones et nous rendons compte de l'expérimentation au laboratoire qui nous a permis de sélectionner parmi elles 8 souches dont les vins présentaient les caractères les plus prononcés des vins de Monbazillac. Cette partie du travail présente un caractère définitif et ne semble pas prêter à discussion. Ce qui ne veut pas dire, bien entendu, qu'en sélectionnant un nombre plus grand de souches on n'aurait pas trouvé des clones donnant des vins encore meilleurs. Mais si on se contente de la qualité des vins obtenus avec les souches sélectionnées, d'ailleurs très grande, cette partie du travail ne pose plus d'autres problèmes à résoudre.

Dans une seconde partie, comprenant les chapitres V, VI nous rendons compte d'essais entrepris en cave ou au laboratoire et qui avaient pour but de dégager une technique de vinification assurant une fermentation du moût avec les levures sélectionnées exclusivement.

La nécessité d'une modification de la technique habituelle qui est extrêmement simple, était à prévoir. Elle s'imposait pour deux raisons au moins :

a) Pour permettre aux levures sélectionnées de dominer les levures indigènes, des mesures d'asepsie vis-à-vis de ces dernières devenaient indispensables :

b) Par ailleurs, la résistance à l'alcool des levures sélectionnées, délimitée au laboratoire, dépend dans une large mesure de la teneur du moût en substances azotées. On peut dire que, dans certaines limites, plus cette teneur est élevée plus la résistance à l'alcool est grande. Or par rapport aux moûts utilisés au laboratoire, ayant perdu une grande partie de leurs substances azotées à l'occasion de la stérilisation, les moûts de la cave présentaient des teneurs très élevées en ces substances.

On ne peut considérer les résultats présentés dans la deuxième

partie de ce travail comme définitifs. Il est évident qu'on ne peut d'une seule expérience en cave déduire une technique sûre. Il aurait fallu pour cela étendre les expériences sur plusieurs vendanges, mais nous ne disposons pas d'un temps suffisant pour les suivre.

Nous avons cependant tenté, tout en tenant compte du caractère provisoire des enseignements fournis par notre expérimentation incomplète, de dégager une proposition de technique qui, répond aux deux conditions citées plus haut : asepsie et teneur en azote du moût.

Une réponse satisfaisante à cette dernière semble être trouvée dans le débourbage et collage suivi de filtration du moût entré en fermentation et ayant atteint 6°. Le débourbage d'une part, la séparation des levures ayant consommé de l'azote d'autre part amènent la teneur des matières azotées du moût à un niveau tel que la levure sélectionnée introduite après filtration sous la forme d'un levain en activité, ne peut dépasser le degré désiré, tout en laissant une quantité suffisante de sucre dans le vin.

En admettant l'efficacité du procédé, une première objection se présente d'emblée dans l'esprit du technicien : ce traitement ne va-t-il pas faire perdre au vin son moelleux ? Il ne semble pas, d'après nos expériences, que la technique proposée entraîne obligatoirement une telle conséquence. D'une part, le débourbage n'intéresse que les bourbes assez grossières : d'autre part, il ne semble pas que la qualité que l'on entend sous le terme de "moelleux" exige la présence de bourbes dans le moût en fermentation. Plus qu'aux substances pectiques et mucilagineuses, le moelleux est lié à la glycérine, produit de la fermentation.

Les opérations, qui comportent le débourbage, le collage et la filtration, sont d'un usage courant dans de nombreuses caves. Leur introduction dans les caves produisant des vins doux ne présente pas de difficultés particulières, tout en exigeant un équipement qu'elles ne possèdent généralement pas.

Les mesures d'asepsie faisant partie de la technique proposée n'exigent l'introduction d'aucun équipement nouveau. Vis-à-vis des levures indigènes apportées par les raisins une asepsie suffisante est atteinte par le collage et la filtration dont il a été question plus haut. Il sera difficile d'assurer la protection contre des pollutions ultérieures, susceptibles de se produire pendant et après la fermentation.

On ne pourra y arriver que par la pratique des règles d'hygiène et d'asepsie strictes pratiquement inconnues par les techniciens des caves. Cela suppose en fait un changement d'attitude du personnel et de la direction, qui pour les premiers ne pourra se faire sans une éducation préalable. Mais la pratique des règles d'hygiène et d'asepsie est courante actuellement dans d'autres industries alimentaires, en particulier dans l'industrie laitière. Il n'y a aucune raison de croire que ces règles ne s'appliqueraient pas avec le même bonheur dans la production des vins doux.

AUTEURS CITÉS

1. CASES. — Essai de sélection de levures pour un vin mousseux naturel. Thèse Toulouse, 1961.

2. DENIGES. — Précis de chimie analytique. Paris, 1930.

3. DOMERCQ. — Etude et classification des levures de vin de la Gironde. Thèse, Bordeaux, 1956.

4. FERRE ARCHINARD. — D'après 6.

5. GILLE, — D'après 6.

6. JAULMES. — Analyse des vins, Montpellier, 1951.

7. KJELDALH. — D'après 6.

8. LODDER, KREGER-VAN RIJ. — The Yeasts, Amsterdam, 1952.

9. OHREMENKO. — D'après GHIMICESCU et FREUND. — Nomogramme pour calculer l'indice de stabilité des vins, bulletin de l'O.I.V., n° 387, mai 1963.

10. RIBEREAU-GAYON, PEYNAUD. — Traité d'Œnologie, tomes I et II. Paris et Liège, 1962.

11. RIPPER. — D'après 6.

12. SEMICHON, FLANZY. — D'après 6.

Table des matières

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER

MILIEUX DE CULTURE - TECHNIQUES ANALYTIQUES

MILIEUX DE CULTURE

a) **Milieux liquides :**

1. Moût de bière 9
2. Eau de levure 9
3. Moût de raisin stérile 9
4. Milieu synthétique minéral 9
5. Extrait de malt 10

b) **Milieu solide :**

Moût de bière gélosé 10

TECHNIQUES ANALYTIQUES

1. Alcool 10
2. Acidité totale 10
3. Acidité volatile 10
4. Anhydride sulfureux libre et total 10
5. Sucres réducteurs 11
6. Azote total 11
   Azote ammoniacal 11
   Azote aminé 11
7. Phosphates totaux 11
   Phosphates minéraux 11

CHAPITRE II

ISOLEMENT DES SOUCHES

Source des levures isolées 13
Isolement des levures 13
Résultats 14

CHAPITRE III

SÉLECTION DES SOUCHES

a) *Première sélection* 19

1. Degré alcoolique 20
2. Acidité volatile 23
3. Rendement 24

b) *Deuxième sélection* 27

CHAPITRE IV

DÉTERMINATION TAXONOMIQUE DE QUELQUES SOUCHES

a) **Détermination des familles** 33
Capacité sporogène 33

b) **Famille des endomycetaceæ** 36

1° Détermination des genres 36

a) Mode de reproduction végétative 36

b) Forme et dimensions des cellules végétatives 36

c) Examen des cultures géantes 36

d) Fermentation des sucres 40

e) Formation de pellicule 42

2° Détermination des espèces 42
Assimilation des sucres 42

c) **Famille des cryptococcaceæ :**

a) Forme et dimensions des cellules végétatives. Caractères de la reproduction 44

b) Cultures géantes 44

c) Fermentation et assimilation des sucres 44

CHAPITRE V

ESSAIS A LA CAVE

Essais à la cave 49

CHAPITRE VI

ESSAIS DE LIMITATION DU DEGRÉ ALCOOLIQUE DU VIN PAR LIMITATION DU TAUX D'AZOTE DU MOUT

Première série d'essais 55
Deuxième série d'essais 60

Résumé et conclusion 65
Auteurs cités 67
Table des matières 69

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

"La fermentation malo-lactique des vins"

VU : Bon à imprimer

Toulouse, le 9 Octobre 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences :
DURAND

VU et permis d'imprimer : n° 537

Toulouse, le 10 Octobre 1963

Le Recteur de l'Académie de Toulouse :
DOTTIN